



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Determinación de la concentración óptima de distintos
agentes crioprotectores para la criopreservación de
espermatozoides epididimarios de alpaca**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal
con mención en Producción y Reproducción Animal

AUTOR

Katherine Rossmory CHOEZ AGUILERA

ASESOR

Alexei Vicent SANTIANI ACOSTA

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Choez K. Determinación de la concentración óptima de distintos agentes crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

Facultad de Medicina Veterinaria

UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIA ANIMAL MENCIÓN PRODUCCIÓN Y REPRODUCCIÓN ANIMAL

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:30 horas del día miércoles 14 de diciembre de 2016, el Jurado Examinador de Tesis designado a llevar a cabo la Sustentación Pública, presidido por el profesor Dr. Víctor Raúl Leyva Vallejos y constituido por los siguientes miembros docentes: Dr. Alexei Santiani Acosta (Asesor), Mg. Luisa Echevarría Curee, Mg. Francisco Franco Febres, Mg. Martha Esther Valdivia Cuya, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"Determinación de la concentración óptima de distintos agentes crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca" presentado por la Bachiller en Medicina Veterinaria:

KATHERINE ROSSMARY CHOEZ AGUILERA

Quien sustentó la tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal mención en Producción y Reproducción Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO (17) DIECISIETE**

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó que la Facultad de Medicina Veterinaria proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal mención Producción y Reproducción Animal, a la Bachiller en Medicina Veterinaria **Katherine Rossmar Choez Aguilera**.

Siendo las 12:00 horas del día miércoles 14 de diciembre de 2016, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

PhD. Víctor Raúl Leyva Vallejos (P.P.D.E.)

Presidente

Mg. Francisco Enrique Franco Febres (P.A.T.C.)

Miembro

Mg. Martha Esther Valdivia Cuya (P.P.T.C)

Miembro

Dr. Alexei Santiani Acosta (P.Asoc.T.P.)

Miembro (Asesor)

Mg. Luisa Echevarría Curee (P.P.T.C.)

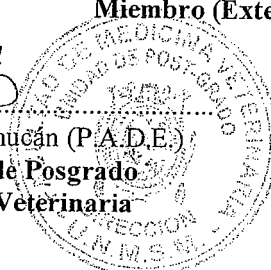
Miembro (Externo)

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.A.D.E.)

Director de la Unidad de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

UNMSM



DEDICATORIA

A Dios,

Por haberme dado el ser, el entendimiento y la salud. Por gozar de tu presencia y compañía todos los días de mi vida.

A mis padres, Ana y Hugo

Por todo su apoyo, ánimo y sobre todo por la confianza que depositaron en mí. Porque siempre, aunque lejos, han estado a mi lado. Los quiero mucho.

A mis hermanos, Milagros y Hugo

Por sus palabras de aliento en los momentos difíciles, por ayudarme a crecer y por compartir conmigo tantos momentos memorables, divertidos y agradables.

A mi sobrinita, Gabriella

Por que desde que llegastes a nuestras vidas, las has llenado de alegría y nos has unido mas como familia, disfrutando de tus risas y travesuras, especialmente de tus travesuras. Te quiero mucho mi pequeñita.

Katherine

AGRADECIMIENTO

A mi asesor Alexei Santiani Acosta,

Por el apoyo y la asesoría que me ha otorgado para la elaboración y culminación de este trabajo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio: Ricardo Castillo, Shirley

Evangelista, Javier Juárez y Diego Evangelista,

Por su colaboración en la realización del trabajo experimental. Gracias por su ayuda y compañía durante todo este tiempo.

A Felipe Ruiz y Rocío Sandoval,

Por elaborar el argumento estadístico de este trabajo de investigación.

A Gianfranco Arroyo,

Por su valiosa ayuda en la comprensión de los datos estadísticos. Sin ti no hubiera sido posible.

A mis amigos: Irma Arriaga y Marino Terreros,

Porque han estado en los momentos alegres y difíciles de mi vida, porque saben comprender el verdadero significado de la amistad que traspasa el tiempo, la distancia y los malos momentos. Por su entera disposición, ya que a pesar de poder estar en otro lado prefirieron quedarse conmigo. Gracias por todo el apoyo brindado, mis queridos amigos los aprecio mucho.

Katherine

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	5
2.1	VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN EN CSA	5
2.2.	OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS	6
2.3.	IMPORTANCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS	8
2.4.	CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE CSA	9
2.5.	EVALUACIÓN DEL SEMEN DE CSA	13
2.6.	FISIOLOGÍA ESPERMÁTICA	16
2.6.1.	Maduración epididimaria	16
2.6.2.	Capacitación y reacción acrosomal	17
2.7.	CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN	18
2.7.1.	Principios de criopreservación	18
2.7.2.	Dilutores y crioprotectores	19
2.7.2.1.	Dilutores de semen	19
2.7.2.2.	Agentes crioprotectores	22
2.7.3.	Factores y alteraciones de la criopreservación	29
2.7.4.	Criopreservación de espermatozoides en camélidos	30
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.2.	Lugar de ejecución y periodo de duración	36
3.3.	Muestra de estudio	36
3.4.	Transporte de los testículos/epidídimos	38
3.5.	Recuperación de los espermatozoides epididimarios	38
3.6.	Diseño experimental	39
3.7.	Dilutor y crioprotectores	47
3.8.	Criopreservación de los espermatozoides epididimarios	47
3.9.	Descongelamiento y evaluación espermática	48
3.10.	Evaluación de los espermatozoides epididimarios	48
3.11.	Análisis de la información	50

	Pág.
IV. RESULTADOS	52
V. DISCUSIÓN	66
VI. CONCLUSIONES	74
VII. RECOMENDACIONES	75
VIII. ANEXOS	76
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE CUADROS

N°	TITULO	Pág.
Cuadro 1.	Métodos de colección y características del semen de alpacas	11
Cuadro 2.	Características espermáticas de la alpaca	12
Cuadro 3.	Características bioquímicas del semen de Camélidos	13
Cuadro 4.	Resultados de criopreservación de espermatozoides de camélidos sudamericanos	34
Cuadro 5.	Motilidad inicial y motilidad post descongelamiento con diferentes concentraciones de glicerol en espermatozoides epididimarios de alpaca	53
Cuadro 6.	Análisis de regresión de las concentraciones de glicerol	54
Cuadro 7.	Análisis de variancia de las concentraciones de glicerol	54
Cuadro 8.	Soluciones de la derivada del modelo de regresión polinomial quíntuple, motilidades estimadas para cada solución e intervalo de confianza al 95% de las motilidades estimadas	54
Cuadro 9.	Motilidad inicial y motilidad post descongelamiento con diferentes concentraciones de etilenglicol en espermatozoides epididimarios de alpaca	58
Cuadro 10.	Análisis de regresión de las concentraciones de etilenglicol	58
Cuadro 11.	Análisis de variancia de las concentraciones de etilenglicol	58
Cuadro 12.	Soluciones de la derivada del modelo de regresión polinomial quíntuple, motilidades estimadas para cada solución e intervalo de confianza al 95% de las motilidades estimadas	59
Cuadro 13.	Motilidad inicial y motilidad post descongelamiento con diferentes concentraciones de DMSO en espermatozoides epididimarios de alpaca	62

Cuadro 14.	Análisis de regresión de las concentraciones de DMSO	62
Cuadro 15.	Análisis de variancia de las concentraciones de DMSO	62
Cuadro 16.	Soluciones de la derivada del modelo de regresión polinomial quíntuple, motilidades estimadas para cada solución e intervalo de confianza al 95% de las motilidades estimadas	63
Cuadro 17.	Efecto de la concentración optima del glicerol, etilenglicol y DMSO sobre las características espermáticas al inicio y después de la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca	65

LISTA DE FIGURAS

N°	TITULO	Pág.
Fig. 1	Obtención de la muestra de estudio	76
Fig. 2	Recuperación de los espermatozoides epididimarios	77
Fig. 3	Esquema de distribución de los tratamientos con Glicerol	40
Fig. 4	Esquema de distribución de los tratamientos con Etilenglicol	42
Fig. 5	Esquema de distribución de los tratamientos con DMSO	44
Fig. 6	Esquema de distribución de los tratamientos con glicerol, etilenglicol y DMSO	46
Fig. 7	Procedimiento de los vapores de nitrógeno líquido	77
Fig. 8	Evaluación de la Integridad funcional de la membrana espermática (Prueba hiposmótica)	78
Fig. 9	Evaluación de Viabilidad e integridad acrosomal (Técnica de doble tinción azul tripan / giemsa)	79
Fig. 10	Diagrama de regresión polinomial quintuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de glicerol	55
Fig. 11	Diagrama de la derivada de la regresión polinomial quintuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de glicerol	56
Fig. 12	Diagrama de regresión polinomial quintuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de etilenglicol	59
Fig. 13	Diagrama de la derivada de la regresión polinomial quintuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de etilenglicol	60

- Fig. 14 Diagrama de regresión polinomial quintuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de DMSO 63
- Fig. 15 Diagrama de la derivada de la regresión polinomial quintuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de DMSO 64

LISTA DE ABREVIATURAS

CSA	: Camélidos sudamericanos
Gl	: Glicerol
Eg	: Etilenglicol
DMSO	: Dimetil sulfóxido
M	: Molar
ml	: Mililitro
μl	: Microlitros
SOD	: Enzima superoxido dismutasa
ICSI	: Técnica de inyección Intracitoplasmática
spz	: Espermatozoide
V.A	: Vagina artificial
Ca	: Calcio
LDL	: Lipoproteinas de baja densidad
UHT	: Ultrapasteurización
TRIS	: tris -hidroximetilaminometano
HCO ₃ ⁻	: Bicarbonato
PKA	: Proteinkinasa A
AMPc	: Adenosin monofosfato ciclico
ERO	: Especies reactivas de oxígeno

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la concentración óptima del glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Para lo cual, se diseñaron 4 experimentos; donde los experimentos 1, 2 y 3 estuvieron conformados por los siguientes tratamientos: T1 (0 M), T2 (0.25 M), T3 (0.5 M), T4 (0.75 M), T5 (1 M), T6 (1.25 M), T7 (1.5 M) y T8 (1.75 M) para los 3 crioprotectores. El análisis estadístico de estos 3 experimentos se realizó mediante un modelo de regresión polinomial quintuple, obteniéndose la concentración óptima de 1.16, 1.02 y 0.9 M para el glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido respectivamente. Luego se realizó un 4 experimento, para determinar cual de los crioprotectores criopreservaba mejor la motilidad, integridad de membrana plasmática y viabilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides epididimarios. El experimento 4, estuvo conformado por las concentraciones óptimas de los tres crioprotectores y en este se utilizó un análisis de varianza, además de la Prueba de Tukey. Los resultados mostraron que el DMSO al 0.9 M obtuvo mayores promedios 35.83, 51.75 y 38.25 % para motilidad, integridad de membrana plasmática y viabilidad e integridad acrosomal respectivamente, sin embargo al compararlo con los promedios obtenidos por el glicerol al 1.16 M (30.83, 45.00 y 33.75 %) no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). Por otro lado al comparar DMSO y glicerol con los promedios alcanzados por etilenglicol al 1.02 M (17.42, 32.17 y 21.00 %) si se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$). En conclusión, las concentraciones de 0.9 M de DMSO y 1.16 M de glicerol conservaron mejor las características espermáticas antes mencionadas a diferencia de la concentración de 1.02 M de etilenglicol.

ABSTRACT

In the present study was determined the optimal concentration of glycerol, ethylene glycol and dimethyl sulfoxide in sperm epididymal alpaca cryopreservation. For this purpose, were designed 4 experiments; where experiments 1, 2 and 3 were composed of the following treatments: T1 (0 M), T2 (0.25 M), T3 (0.5 M), T4 (0.75 M), T5 (1 M), T6 (1.25 M), T7 (1.5 M) and T8 (1.75 M) in the 3 cryoprotectants. Statistical analysis of these three experiments were performed using a polynomial regression model quintuple, obtaining the optimal concentration of 1.16, 1.02 and 0.9 M glycerol, ethylene glycol and dimethyl sulphoxide respectively. Fourth experiment was then carried out to determine which of the cryoprotectants cryopreserved best the motility, plasma membrane integrity and viability and acrosomal integrity of sperm epididymal. The experiment 4 was comprised of optimal concentrations of the three cryoprotectants, for which was used a analysis of variance in addition to the Tukey test. The results showed that DMSO 0.9 M scored higher averages 35.83, 51.75 and 38.25% for motility, plasma membrane integrity and viability and acrosome integrity respectively, however when compared to the averages obtained by glycerol 1.16 M (30.83, 45.00 and 33.75%) were not statistically significant differences ($p < 0.05$). On the other hand when comparing DMSO and glycerol with the average achieved by 1.02 M of ethylene glycol (17.42, 32.17 and 21.00%) were significant differences ($p < 0.05$). In conclusion, the concentrations of 0.9 M of DMSO and 1.16 M of glycerol preserved better the sperm characteristics unlike concentration 1.02 M ethylene glycol.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han venido realizando algunas investigaciones sobre conservación de semen fresco, refrigerado y congelado de camélidos sudamericanos (CSA) para utilizarlos en inseminación artificial, sin embargo no se ha obtenido el éxito esperado como en otras especies domésticas. Esto podría ocurrir debido las características particulares que presenta el semen de los CSA, principalmente la alta viscosidad, bajo porcentaje de motilidad y baja concentración espermática. Estas características espermáticas han condicionado la evaluación, manipulación, dilución y conservación del semen en esta especie. Otros factores que influenciarían el lento avance en la conservación del semen de los CSA serían la postura adoptada durante la cópula, la duración de la misma y el patrón de eyaculación, que impiden recuperar por medios artificiales de colección un eyaculado semejante al obtenido durante una cópula normal. Por lo que consecuentemente ha ocasionado un retraso en el desarrollo e implementación de un banco de germoplasma, el cual sumado a la inseminación artificial, permitiría acelerar el progreso genético, ya que contribuiría a acortar el intervalo generacional y a la propagación más rápida de animales genéticamente superiores.

Los espermatozoides epididimarios constituyen un modelo experimental para el desarrollo de los trabajos de conservación de semen, ya que se encuentran en un nivel de maduración

final y no están mezclados con el plasma seminal viscoso. Además su manipulación es fácil debido a que la muestra obtenida no es espumosa ni viscosa y principalmente no se encuentran contaminadas con impurezas del suelo u orina, como en otros métodos de colección. Otras ventajas que ofrece el uso de espermatozoides epididimarios son: no utilizar un macho, ni realizar un entrenamiento previo de éste, tampoco requiere tener hembras en celo o acondicionamiento de una vagina artificial; además no utiliza equipos costosos para realizar una electroeyaculación. Sin embargo la principal ventaja del uso de espermatozoides epididimarios está orientada principalmente al rescate del germoplasma de individuos muertos súbitamente y sin patologías reproductivas, cuyas especies se encuentran en peligro de extinción y cuyas colectas de semen sean difíciles de realizar.

Actualmente ya se cuenta con algunas investigaciones realizadas por diversos autores sobre criopreservación de espermatozoides epididimarios, pero hasta la fecha los parámetros post descongelamiento como por ejemplo la motilidad, es muy variable y deficiente. Luego del congelamiento, las motilidades varían entre 0 a 34 % (Morton *et al.*, 2007, 2010; Canorio, 2008; Banda *et al.*, 2010; Mancisidor, 2013; Choez *et al.*, 2013; Terreros *et al.*, 2015) a partir de motilidades iniciales de 30-70 %. Asimismo existe una gran limitación en lo concerniente al desarrollo de protocolos adecuados para la conservación de espermatozoides de CSA que estandaricen el dilutor y crioprotector empleado, la temperatura de equilibrio, la velocidad de congelación y descongelación, entre otros. Como muestra de ello se han venido utilizando diferentes dilutores, los mas comúnmente utilizados son a base de TRIS (tris -hidroximetilaminometano), citrato, lactosa o leche descremada con glucosa o fructuosa y yema de huevo (Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2007, 2010; Banda *et al.*, 2010; Choez *et al.*, 2013; Terreros *et al.*, 2015).

Las razones para la escasa supervivencia de los espermatozoides de CSA al proceso de criopreservación no están bien entendidas; sin embargo, algunos factores como la susceptibilidad inherente de cada especie, los componentes de los dilutores y la producción de especies reactivas de oxígeno que son factores sugeridos en otras especies, donde tampoco ha sido posible obtener elevados porcentajes de supervivencia espermática post

descongelamiento (Medeiros *et al.*, 2002) podrían explicar la escasa supervivencia de los espermatozoides de CSA al proceso de criopreservación.

Con respecto a los componentes de los dilutores, un componente importante son los crioprotectores. Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrólitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación (Stornelli *et al.*, 2005). El crioprotector y su concentración varían según la especie. Tal es el caso del glicerol, el cual ha sido empleado en bovinos, caninos, primates y algunos rumiantes salvajes en concentraciones de 4 (0.548 M) - 8 % (1.096 M) (Mayenco y Gómez-Cuétara, 1996; Peña *et al.*, 1998; Holt, 2000). Sin embargo, los cerdos y ratones no toleran concentraciones superiores al 3 % (0.411 M) y 1.75 % (0.239 M), respectivamente. Por otro lado, debido a los efectos tóxicos del glicerol se han empleado otros crioprotectores como el etilenglicol y el dimetilsulfoxido (DMSO). Por su parte, el etilenglicol ha sido utilizado en ovinos a concentraciones de 1,5 (0.269 M) y 6 % (1.078 M) (Molinia *et al.*, 1994) y en equinos en un 3 % (0.539 M) (Mantovani *et al.*, 2002). Con respecto al DMSO, se ha empleado en primates al 6 % (0.84 M) (Feradis *et al.*, 2001), peces al 10 % (1.4 M) (Lahnsteiner *et al.*, 2000) y conejos al 12 % (1.68 M) (Bamba y Adams, 1990).

En alpacas, el crioprotector más utilizado es el glicerol; el cual ha sido empleado en concentraciones de 2 - 4% (0.27- 0.55 M) (Morton *et al.*, 2010), 6% (0.82 M) (Banda *et al.*, 2010) y 7% (0.96 M) (Santiani *et al.*, 2005; Terreros *et al.*, 2015). Asimismo se ha utilizado el etilenglicol, a las concentraciones de 0.7% (0.125 M) (Santiani *et al.*, 2005), 1% (0.2 M) (Banda *et al.*, 2010) y 7% (1.25 M) (Terreros *et al.*, 2015). También se han usado diferentes concentraciones de DMSO como 0.9 % (0.125 M), 1.8% (0.25 M) y 3.5 % (0.5 M) (Canorio, 2008) y 7 % (0.98 M) (Terreros *et al.*, 2015). Sin embargo, aún no se ha establecido cuál agente crioprotector y a qué concentración ofrece mejores parámetros post descongelamiento de las muestras criopreservadas. Esto es importante conocer, ya que la concentración óptima de un crioprotector representa siempre un compromiso entre los efectos protectores y los efectos tóxicos.

Por lo expuesto, el objetivo general del presente estudio fué:

- Determinar cuál de los agentes crioprotectores (glicerol, etilenglicol y DMSO) en su concentración óptima criopreservaba mejor la motilidad espermática, la integridad funcional de la membrana plasmática y la viabilidad e integridad de la membrana acrosomal de los espermatozoides de alpaca.

y como objetivos específicos, tuvimos:

- Determinar la concentración óptima del glicerol sobre la motilidad espermática post descongelamiento de los espermatozoides de alpaca.
- Determinar la concentración óptima del etilenglicol sobre la motilidad espermática post descongelamiento de los espermatozoides de alpaca.
- Determinar la concentración óptima del DMSO sobre la motilidad espermática post descongelamiento de los espermatozoides de alpaca.

II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos, se detallan a continuación:

a) Aspiración vaginal post copula

Es un método no invasivo que no necesita el entrenamiento de los machos ni altera la conducta sexual del macho pero la desventaja es que el semen obtenido está contaminado y diluido con las secreciones del tracto genital femenino, que como es sabido son desfavorables para la supervivencia de los espermatozoides. Además el eyaculado obtenido puede ser incompleto o no representativo, ya que la muestra se toma de la vagina y la eyaculación en los camélidos sudamericanos es intracornual.

b) Electroeyacuación

La ventaja de este método es que no se requiere tener hembras en celo, se acorta el tiempo de colección, es aplicable a lo largo de todo el año y se pueden obtener eyaculados sin espuma (Giuliano, 2012). Los resultados del método de electroeyacuación muestran gran variabilidad entre animales y aún entre el mismo animal, además de obtenerse semen muy diluido con las secreciones de las glándulas accesorias, contaminado con orina y baja concentración espermática. Sin embargo su mayor desventaja es que se necesitan profesionales y equipo especializado para realizar anestesia general y el protocolo correcto de preparación y estimulación eléctrica (Giuliano, 2012).

c) Vagina artificial

La colección de semen con vagina artificial presenta la ventaja de no necesitar de un equipo de costo elevado y que puede ser llevado a cabo por técnicos especializados. Una de las principales desventajas que presenta es que se necesita contar con cierta cantidad de días dedicados al entrenamiento de los machos, reportándose porcentajes de rechazo del 10 al 40% por indocilidad o falta de libido (Aller *et al.*, 2003). Esta circunstancia puede hacer imposible la colección de semen en machos seleccionados. Y por otro lado los eyaculados colectados suelen contener impurezas del suelo o ser muy espumosos (Giuliano *et al.*, 2008).

2.2. OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS

a) Desviación de los conductos deferentes

Con el fin de coleccionar espermatozoides libres de la secreción de las glándulas accesorias en alpacas, se desarrollaron las técnicas de desviación de los conductos deferentes y la extirpación de la próstata; la primera técnica intenta coleccionar espermatozoides directamente de su reservorio, la cola del epidídimo, sin que estos

tengan contacto con las secreciones de las glándulas accesorias, desviando quirúrgicamente los conductos deferentes hacia la región ventral del animal o la cara interna del muslo, formando una fistula permanente en la piel desde donde se pueden colectar continuamente sin la necesidad de tener hembra receptiva ni someter a los espermatozoides a la acción de enzimas proteolíticas que intenten licuefactar el coágulo del eyaculado para un mejor manejo espermático (Quintano, 2002).

b) Recuperación de espermatozoides epididimarios

Para la recuperación de espermatozoides epididimarios se han descrito los siguientes métodos:

- **Incisiones:** Es un método rápido y fácil. Consiste en realizar varias incisiones longitudinales en la cola del epidídimo con la finalidad de exponer a los espermatozoides al ambiente externo. La cola del epidídimo incidida se lava inmediatamente con un medio especial en una placa Petri y se deja por 5 minutos, de tal manera que los espermatozoides flotan en el medio y pueden ser recuperados posteriormente. La desventaja radica en que existe la posibilidad de contaminación de los espermatozoides recuperados con sangre durante el proceso. Sin embargo este proceso tiene un buen grado de recuperación de espermatozoides epididimarios (Guerrero, 2006).
- **Picadillo:** La cola del epidídimo es colocada en una placa Petri y picada por 10 minutos, y luego se agrega el medio de lavado a la placa. La muestra se filtra y es centrifugada 2 veces. Este método ofrece buena recuperación de espermatozoides, pero frecuentemente se contamina con sangre y restos de tejido, lo que requerirá un largo proceso de filtración y remoción de los detritos; además la viabilidad espermática puede afectarse por la centrifugación y la exposición a los componentes sanguíneos (Guerrero, 2006).

- **Enjuage:** Consiste en aplicar presión desde el conducto deferente hasta que el contenido de la cola epididimaria emerja por un corte hecho cerca de la unión con el cuerpo del epidídimo (Martinez- Pastor *et al.*, 2006). Con este fin, se inserta en el conducto deferente una aguja sin filo (el tamaño depende de la especie) y se le acopla una jeringa de 3 ml de medio de lavado, introduciéndose el líquido en el epidídimo (Guerrero, 2006); sin embargo, algunos autores sólo utilizan aire (Martinez- Pastor *et al.*, 2006). Este método provee el rango de recuperación más alto y la menor contaminación (Guerrero, 2006).

Las ventajas de usar espermatozoides epididimarios o de los conductos deferentes consisten en que estas células presentan motilidad progresiva y el manejo en el laboratorio es sencillo por la ausencia de viscosidad del plasma seminal y de espuma de los eyaculados que son obtenidos por vagina artificial. La principal desventaja es que en estos métodos no se pueden obtener muestras sucesivas de un mismo macho (espermatozoides epididimarios) y que con el tiempo inutilizan reproductivamente al macho (desviación de los conductos deferentes) (Giuliano *et al.*, 2012).

2.3. IMPORTANCIA DE LOS ESPERMATOZOIDEOS EPIDIDIMARIOS

Los espermatozoides procedentes de la cola del epididimo se encuentran en un nivel de maduración final (Canorio, 2008), son viables y poseen capacidad fecundante (Reyes-Moreno *et al.*, 2002, Barrios, 2002). Por ello, la recuperación de estos ha cobrado importancia:

- En animales domesticos ya que constituyen un modelo experimental, para ser utilizado en animales silvestres en peligro de extinción (Díaz y Ojeda, 2000).
- Para rescatar el germoplasma de animales domesticos de alto valor genético (Reyes-Moreno *et al.*, 2002) o de animales silvestres en peligro de extinción (Anel *et al.*, 2002) que hayan muerto de forma repentina sin alteraciones organicas o reproductivas.

- En la criopreservación espermática de diversas especies como ratones, ciervos, ovinos, gatos, perros, equinos, e incluso en el panda gigante (Gonzales *et al.*, 2013)
- Para su uso en la inseminación artificial o fecundación in vitro (Barrios, 2002)

2.4. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

El semen de los camélidos sudamericanos se caracteriza por: alta viscosidad, bajo porcentaje de motilidad y baja concentración espermática; además las características seminales son muy variables entre machos, y entre eyaculados colectados de un mismo macho (Morton *et al.*, 2008, Giuliano *et al.*, 2012), lo que puede conllevar a problemas en la obtención de eyaculados de buena calidad para ser utilizados en la conservación de semen e inseminación artificial.

El semen está compuesto de 11,5 % de espermatozoides y 88,5 % de plasma seminal por volumen (Garnica *et al.*, 1993). El color del semen depende de la concentración espermática y la proporción de la secreción de las glándulas accesorias (Tibary y Memon, 1999), por lo que generalmente se observa una coloración que varía del blanco lechoso al blanco cristalino. En alpacas, los valores del pH son ligeramente alcalinos de 7.2 a 7.5 en promedio (Bravo *et al.*, 1997b). El eyaculado tiene un volumen variable y está influenciado por el método de colección empleado y el número de eyaculaciones al día (Bravo *et al.*, 1997a), siendo en promedio de 1- 2 ml y los valores oscilan desde 0.4 hasta 12.5 ml (Garnica *et al.*, 1993).

De igual manera, la concentración espermática es variable y se ve afectada por la edad, el método de colección empleado, el número de eyaculaciones al día y el volumen del eyaculado (Tibary y Vaughan, 2006), además la interrupción de la cópula resulta en concentraciones espermáticas reducidas (Bravo *et al.*, 2002). La concentración disminuye en sucesivas eyaculaciones, pero no hay diferencia en la concentración si se observa en un intervalo de al menos 12 h entre cada eyaculación (Bravo *et al.*, 1997b). Se han reportado concentraciones de alrededor de 100 millones de espermatozoides por ml (Bravo *et al.*, 1997b; Aller *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2005).

La motilidad es oscilatoria ya que la mayoría de los espermatozoides van y vienen y sólo del 5 al 10 % de estos tienen un movimiento individual progresivo activo (Bravo *et al.*, 1997a). Al parecer la alta viscosidad del plasma seminal así como la baja concentración espermática determinan los patrones de motilidad; por ello, la motilidad del espermatozoide aumenta a medida que el eyaculado se vuelve más líquido (Tibary y Memon, 1999). La mayoría de investigadores no reportan una motilidad masal en los eyaculados de camélidos; no obstante, Tibary y Vaughan (2006) mencionan que la motilidad masal puede ser observada en un eyaculado no diluido si la concentración espermática es suficientemente alta. El semen de camélidos es altamente viscoso y forma un coágulo poco después de la cópula, por lo que es difícil de manipularlo (Por ejemplo pipetearlo, teñirlo en un portaobjetos), difícil de determinar características como concentración y motilidad espermáticas y difícil de diluir (Tibary y Memon, 1999).

La viscosidad del semen puede atribuirse a la presencia de mucopolisacáridos de las secreciones de las glándulas bulbouretrales o la próstata (Garnica *et al.*, 1993). El papel fisiológico de esta característica no está claro. Dado que, en camélidos, el semen es depositado intracornualmente por hasta 2 días antes de la ovulación, el atrapamiento de los espermatozoides en el coágulo en estas especies podría actuar como un tipo de depósito espermático, cumpliendo probablemente la función fisiológica similar al llamado depósito cervical espermático en otros rumiantes domésticos (Sumar, 2002). Además, la alta viscosidad del semen podría ser importante en el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides en el útero, hasta que ocurra la ovulación (24- 30 h post cópula), ya que la alta viscosidad impediría que el espermatozoide tenga movimientos progresivos activos, por lo que habría un menor desgaste de energía y producción de radicales libres producto de su propio metabolismo. El grado de viscosidad varía entre machos y disminuye al aumentar el número de eyaculaciones al día (Tibary y Memon, 1999). Por otra parte, el semen se licua 23 horas (rango 8- 30 h) post colección (Garnica *et al.*, 1993).

Cuadro 1. Métodos de colección y características del semen de alpacas

Referencia	Año	Método de colección de semen	Duración de la cópula (min)	Características del eyaculado			
				color	consistencia	volumen	pH
Mogrovejo	1952	Funda vaginal		lechoso	viscosa	1.98±0.26	8.3
von Kubicek	1974	Fistula uretral				6.6	7.5
Sucapuca	1991	Preservativo				0.67±0.42	7.3
Garnica <i>et al</i>	1993	V.A + maniquí		lechoso cremoso	viscosa	1.7±0.2	
Bravo	1995	Electroeyaculación				1.4	7.6
		V.A + maniquí		lechoso	viscosa	1.7	7.5-7.8
Bravo <i>et al</i>	1997	V.A	17.9±0.7		viscosa	1.6±0.7	7.8±0.03
Bravo <i>et al</i>	1997	V.A	21.8	blanco cremoso	viscosa	1.9±0.4	7.2
Fowler y Bravo	1998			lechoso cremoso	gelatinosa	1.9±0.4	7.2±7.8
Valdivia <i>et al</i>	1999	V.A				2.5-3.2	
Bravo <i>et al</i>	2000	V.A + maniquí			viscosa		
Raimundo <i>et al</i>	2000	V.A + maniquí Desv conductos	28.4±8.4		viscosa	2.6±1.8	
Paricahua	2001	deferentes		blanco cristalino		0.2-1.0	7.88
Bravo	2002	V.A + maniquí		lechoso traslucido	semiviscosa		
Flores <i>et al</i>	2002	V.A + ♀	12.3±7.2	blanco opalescente		1.8±0.8	
		V.A + maniquí + ♀	16.8±0.7			1.73±0.1	
Davalos y Olazabal	2002	V.A + maniquí	15.9±0.6			1.03±0.04	
		Funda vaginal	15-20		viscosa		
Santiani <i>et al</i>	2005	V.A + maniquí	>15		viscosa		
Morton <i>et al</i>	2009	V.A + maniquí			6.30±0.9	1.48 ±0.14	

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 2. Características espermáticas de la alpaca

Referencia	Año	Método de colección	Características espermáticas					
		semen / spz	Concentración SPZ (10 ⁶ /ml)	Motilidad (%)	Spz vivos (%)	Spz normal (%)	Integridad acrosoma (%)	Integridad Mb plasmática (%)
Mogrovejo	1952	Funda vaginal	33	bajo		41		
von Kubicek	1974	Fistula uretral	0.6	0-85				
Sucapuca	1991	Preservativo	0.84	lenta				
Garnica <i>et al</i>	1993	V.A + maniquí		50				
Bravo	1995	Electroejaculación	0.032	media				
		V.A + maniquí	0.15	oscilatoria	76	76		
Bravo <i>et al</i>	1997	V.A	72.4±7.9	78.8±2.3	75.5±2.2	75.5±0.9		
Bravo <i>et al</i>	1997	V.A	2.9±0.15	85.0±5.2	69.6±3.7	75.9±2.1		
Fowler y Bravo	1998		147.5±8.0	85.0±5.2	69.6±3.7	75.9±2.1		
Valdivia <i>et al</i>	1999	V.A		60-98				
Bravo <i>et al</i>	2000	V.A + maniquí		68.2	74.9			
Raimundo <i>et al</i>	2000	V.A + maniquí	0.062±0.037	49.7±22.6				
Paricahua	2001	Desv conductos def	5150		94.25			
Bravo	2002	V.A + maniquí	30- 170	40-80	45- 90			
Flores <i>et al</i>	2002	V.A + ♀	600	alta				
		V.A + maniquí + ♀	0.575±0.083	68.9±4.9	72.1±1.9	86		
		V.A + maniquí	0.328±0.043	34.2±5.3	34.3±4.2	85		
Santiani <i>et al</i>	2005	Funda vaginal	17.7					
		V.A + maniquí	80	60	80.7 ± 10.1		78.3 ± 10.0	
Morton <i>et al</i>	2009	V.A + maniquí	455.1±69.7	48.0± 2.2			91.5±1.9	
Morton et al.	2007	Epidídimo	123.5±22.2	46.9±4.5			90.6±1.5	
Canorio	2008	Epidídimo	45	42.6	72.47			63.15
Rodríguez	2009	Epidídimo		22.14±3.38	78.69±1.77		80.94±2.96	89.08±1.35
Morton et al.	2010	Epidídimo	75.3±22.5	52.7±3.3			89.3±3.3	
Banda et al.	2010	Epidídimo	39.0 ± 17.0	31.3 ± 3.5				34.5 ± 3.0
Terreros et al	2015	Epidídimo		68.89±6.07				53.93±8.51

Fuente: Elaboración propia

La composición bioquímica del semen de camélido es similar a la reportada para otras especies de ganado (Tibary y Vaughan, 2006). El cloruro es el anión principal y el Ca es el catión principal. Estos electrolitos podrían ser importantes en los procesos fisiológicos de motilidad y capacitación espermática (Garnica *et al.*, 1993). La glucosa, principal sustrato energético; se encuentra en mayor concentración en alpacas jóvenes (Garnica *et al.*, 1993). Otros componentes del semen como lípidos, fosfolípidos y proteínas podrían desempeñar un papel en la maduración y protección de la integridad de la membrana celular espermática (Garnica *et al.*, 1993).

Cuadro 3. Características bioquímicas del semen de camélidos

Componentes	Unidad	Alpaca de 3 años	Alpaca de 6 años
Ácido cítrico	mg/dl	4.3±0.3	
Cloro	mEq/l	348±32	404±34
Calcio	mg/dl	18±1	18±3
Fosforo	mg/dl	12±2	8±0.4
Glucosa	mg/dl	7±0.4	5±0.3
Fructosa	mg/dl		6±0.1
Lípidos	mg/dl	86±10	95±10
Fosfolípidos	mg/dl	29±1	29±1
Nitrógeno total	mg/dl	548±50	647±32
Proteína total	g/dl	3±0.3	4±0.2
Albúminas	g/dl	2±0.3	2±0.2
Globulinas	g/dl	1±0.1	2±0.2

(Garnica *et al.*, 1993)

2.5. EVALUACIÓN DEL SEMEN DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

La mayoría de investigadores en el área de reproducción de camélidos están intentando diseñar el “Análisis seminal ideal”, que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal en estas especies; sin embargo la falta de métodos confiables y precisos para la evaluación espermática de camélidos constituye un gran impedimento para el desarrollo e implementación de técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial. Esto ocurre principalmente por la alta viscosidad del semen que dificulta la

adaptación de los métodos existentes para la evaluación de semen de otras especies domésticas (Tibary y Memon, 1999), seguida de un “factor individuo” el cual determina que cada macho presenta características diferentes para cada variable y que ciertas características presentan variabilidad inherente o propia de la especie; lo que permite explicar la amplitud de los rangos de las características seminales reportadas por diferentes autores (Giuliano *et al.*, 2008).

a) Evaluación de la motilidad espermática

Es de conocimiento que el método tradicional de estimación de la calidad seminal de diferentes especies es principalmente la evaluación de la motilidad; no obstante, debido a la motilidad oscilatoria y no progresiva del espermatozoide de camélido, el porcentaje de motilidad espermática no sería un buen estimador de la calidad del semen (Bravo *et al.*, 2002). El método se basa en la observación microscópica inmediata (40 x) de una muestra seminal en una lámina portaobjetos temperada, determinándose el porcentaje de espermatozoides móviles sobre el total de espermatozoides visualizados (Ax *et al.*, 2000). Este parámetro si puede ser evaluado en espermatozoides epididimarios, ya que estos presentan motilidad progresiva (Giuliano *et al.*, 2012).

b) Evaluación de la integridad funcional de la membrana espermática

La membrana espermática es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, función que le permite adaptar su metabolismo al medio externo (Cooper, 2002). La evaluación de su capacidad funcional constituye información importante considerando que la integridad de la membrana plasmática tiene estrecha relación con una adecuada capacitación y reacción acrosómica y por tanto, con la fertilidad espermática (Yanagimachi, 1993).

Dentro de las pruebas desarrolladas a partir de este fenómeno, destaca la prueba hipoosmótica o HOS (hyposmotic swelling test), que consiste en situar los

espermatozoides en presencia de un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo, provocando un hinchamiento y enrollamiento de la cola del espermatozoide. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. Los espermatozoides con la membrana funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma de la cola (Jeyendran *et al.*, 1984).

En el semen de camélido hay una importante población de espermatozoides inmóviles, pero con las membranas funcionales e intactas (Giuliano *et al.*, 2008), motivo por el cual esta evaluación toma vital importancia al momento de descartar un eyaculado, ya que la inmovilidad de los espermatozoides puede deberse a alta viscosidad del plasma seminal y no necesariamente a que la población espermática este muerta. La prueba hipoosmótica se realiza mediante un microscopio, donde se diferencia la cantidad de espermatozoides con membrana funcional de aquellos que no la posean y el resultado se expresa en porcentaje. La prueba hipoosmótica se ha realizado en espermatozoides de alpaca (Banda *et al.*, 2010, Terreros *et al.*, 2015, Santiani *et al.*, 2013).

c) Evaluación de la viabilidad e integridad de la membrana acrosomal.

El acrosoma contiene enzimas que desarrollan un papel crucial en la penetración de la zona pelúcida del ovocito (Garner y Hafez, 2002), por ello, el porcentaje de espermatozoides que poseen un acrosoma intacto y que son aptos para exhibir reacción acrosómica, es una importante característica seminal. La evaluación de este componente espermático toma mayor relevancia en espermatozoides criopreservados, ya que en el proceso de dilución, refrigeración y congelación queda particularmente afectada la membrana del acrosoma (Hammerstedt *et al.*, 1990) y por tanto, capaz de afectar a la habilidad fecundante del espermatozoide (Watson, 2000).

En la evaluación de las lesiones celulares derivadas del proceso de criopreservación es necesario emplear métodos de tinción que permitan diferenciar, correctamente, células viables con reacción acrosómica de las células que se encuentran muertas y que han perdido la integridad de la membrana (Way *et al.*, 1995). En este sentido, determinadas combinaciones de marcadores pueden ser utilizadas para evaluar, simultáneamente, la viabilidad de la célula y el *status* del acrosoma.

Por su parte, Didion *et al.* (1989) desarrollaron una técnica de doble tinción para la evaluación de la vitalidad e integridad acrosomal de espermatozoides humanos, esta consistía en la utilización de un colorante vital: el azul tripán para la diferenciación de espermatozoides vivos y muertos y el giemsa para la determinación de la integridad acrosomal. En alpacas, Santiani *et al.* (2005) realizaron los intentos iniciales para validar esta técnica en espermatozoides criopreservados, encontrando un efectivo método de evaluación de la vitalidad e integridad acrosomal.

2.6. FISIOLOGÍA ESPERMÁTICA

2.6.1. MADURACIÓN EPIDIDIMARIA

Los espermatozoides del testículo y los que se encuentran presentes en las regiones próximas al epidídimo son incapaces de unirse a la zona pelúcida y fecundar al ovocito. Una vez que alcanzan el epidídimo (y durante su pase del mismo) comienza el proceso de maduración espermática. El proceso de maduración se debe en gran medida a la actividad de secreción y reabsorción en el epidídimo de pequeñas moléculas (azúcares y electrolitos) y macromoléculas (proteínas, glicoproteínas, etc), que crean cambios secuenciales en la composición del fluido epididimario en toda su longitud (Tulsiani, 2006).

La maduración espermática comprende: a) Cambios en la carga de toda la superficie celular, resultado de modificaciones en las proteínas de la membrana plasmática; b) Modificación en la composición lipídica del espermatozoide; c) Un marcado incremento en

el vigor de la movilidad, el paso del movimiento circular a progresivo, y por una mayor retención de la actividad flagelar del espermatozoide; d) El desplazamiento de la gota citoplasmática del cuello a la pieza media del flagelo.

2.6.2. CAPACTACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL

Para que los espermatozoides de mamífero sean capaces de fertilizar al ovocito, es necesario que estos permanezcan cierto tiempo dentro del aparato genital de la hembra, experimenten procesos de capacitación y se preparen para la reacción acrosomal y la unión con los ovocitos (Yanagimachi, 1994). La capacitación *in vivo* puede suceder en el útero o en el oviducto, dependiendo de la especie.

A medida que avanza la capacitación, en los espermatozoides se producen cambios bioquímicos, sin que tengan lugar cambios morfológicos, los más conocidos son los siguientes: 1) Aumento de la adenilciclase y AMPc; 2) Aumento del pH intracelular (Parrish *et al.*, 1994); 3) Incremento de la entrada de Ca^{2+} (Boerke *et al.*, 2008) y 4) Modificación o alteración de la membrana plasmática de los espermatozoides y fosforilación de proteínas (Visconti *et al.*, 2010).

Los niveles bajos de bicarbonato (HCO_3^-) que se encuentran en el epidídimo mantienen al espermatozoide en un estado “no capacitado”, mientras que los niveles altos como los que hay en el fluido oviductal favorecen la capacitación espermática (Rodríguez- Martínez *et al.*, 1990). El HCO_3^- actúa activando la adenilciclase incrementando así la concentración intracelular de AMPc quien, activa la cascada de señalización de la proteinkinasa A (PKA). La PKA regula, el metabolismo de los lípidos y va a producir cambios a nivel de la composición lipídica de la membrana espermática dando como resultado un aumento de la fluidez de la misma (Fraser *et al.*, 2005).

De igual manera, la capacitación espermática es un proceso dependiente de Ca^{2+} , el cual aumenta en los espermatozoides capacitados. El ingreso de Ca^{2+} activa la adenilciclase con la consiguiente activación de la PKA que a su vez favorece la fosforilación de distintas proteínas espermáticas (Visconti *et al.*, 1995). Asimismo, esta cascada de activación vía

AMPC también va a modificar el metabolismo espermático produciendo el aumento de la motilidad de los espermatozoides capacitados conocido como “hiperactivación espermática” (Flesch y Gadella, 2000).

Una vez que el espermatozoide se encuentra capacitado, experimenta el proceso de reacción acrosómica, el cual implica múltiples fusiones entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, permitiendo la liberación de enzimas hidrolíticas del contenido acrosomal a través de las membranas fenestradas. Estas enzimas son necesarias para disolver la estructura de la zona pelúcida y permitir que el espermatozoide ingrese al espacio perivitelino y pueda ocurrir la fecundación (Tulsiani et al., 1998).

2.7. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

La criopreservación de semen es una herramienta muy importante para la reproducción asistida de diversos individuos y para salvaguardar los caracteres genéticos de mejoramiento de las especies, así como también para la preservación de muchas especies y razas que están en peligro de extinción.

2.7.1. PRINCIPIOS DE CRIOPRESERVACIÓN

El espermatozoide durante el proceso de criopreservación se ve sometido a estrés debido a las alteraciones de la temperatura y la formación y disolución de los cristales de hielo (Watson, 1995). El mayor estrés que experimenta el espermatozoide es cuando la célula tiene que mantener su viabilidad en un rango de temperatura entre los -15 a -60°C que corresponde a dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A -196 °C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130 °C no existe agua en el estado líquido (Mazur, 1984).

Cuando la suspensión celular se enfría por debajo de los 0 °C, se produce la formación de hielo en el medio extracelular, sin embargo los espermatozoides permanecen suspendidos en la fracción líquida, ya que la membrana plasmática actúa como barrera, impidiendo la

expansión de los cristales de hielo del medio exterior hacia el medio intracelular (Watson, 1979). Las sales no forman parte de los cristales de hielo, por lo que habrá una mayor concentración de sales en la fracción líquida no congelada. El aumento de la osmolaridad provoca la difusión del agua intracelular hacia el medio extracelular, causando la deshidratación de la célula y de la membrana plasmática (Amann y Pickett, 1987). Por ello la principal causa de las alteraciones ultraestructurales de la membrana plasmática es la deshidratación osmótica, cuya consecuencia es la pérdida de la selectividad de la membrana (Parks y Graham, 1992).

Durante la congelación, las células recuperan el equilibrio dependiendo del ritmo de refrigeración y su permeabilidad al agua. Si el ritmo de enfriamiento es lento o si la permeabilidad al agua es elevada, las células se equilibran por difusión del agua intracelular hacia el hielo externo; pero si el ritmo de enfriamiento es rápido si su permeabilidad al agua es baja, éstas se van a equilibrar, por congelación intracelular (Mazur, 1970). La presencia de cristales de hielo extracelular, no causa ruptura de la membrana plasmática ni tampoco daños irreversibles (Watson, 1979). Sin embargo, la formación de cristales de hielo intracelular provoca lesión y muerte de la célula. Por otro lado, la descongelación está condicionado por el proceso de congelación. Por tanto, si el ritmo de enfriamiento es rápido, el de calentamiento también lo debe ser; pero, si el ritmo de enfriamiento es lento también debe serlo el de calentamiento. Las células que contienen microcristales de hielo intracelulares deben ser recalentadas muy rápidamente a fin de evitar la recrystalización de estos pequeños cristales, en grandes cristales que pueden dañar las células (Amann y Pickett, 1987).

2.7.2. DILUTORES Y CRIOPROTECTORES

2.7.2.1. DILUTORES DE SEMEN

Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal, el cual le suministra los nutrientes necesarios para mantener una elevada actividad metabólica necesaria para el proceso de transporte espermático a través del tracto reproductivo de la hembra. En el

eyaculado, esta actividad metabólica solo puede mantenerse durante un tiempo muy limitado. Para mantener los espermatozoides por periodos más prolongados, ya sea por enfriamiento o criopreservación, se hace necesaria e imprescindible la adición de sustancias que prolonguen la vida de estas células germinales. El dilutor es el elemento que contiene las sustancias necesarias para mantener o incrementar la viabilidad espermática (Illera, 1994).

Un buen dilutor debe: - Proveer nutrientes como fuente de energía, - Proteger a los espermatozoides del efecto dañino del enfriamiento, - Mantener un adecuado equilibrio del pH, - Mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico, - Inhibir el crecimiento bacteriano, - Incrementar el volumen de semen para que pueda ser usado para múltiples inseminaciones y – Proteger a los espermatozoides durante el congelamiento (Hafez, 2002).

Entre los principales componentes de los dilutores, se tienen:

➤ **Leche de vaca**

La leche de vaca puede emplearse tanto entera, descremada, UHT o en polvo para reconstituir, siendo esta última la más universal. Las proteínas de la leche actúan como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salomon y Maxwell, 2000).

La caseína, la principal proteína de la leche, también tiene un efecto antioxidante y por lo tanto confiere protección a los espermatozoides durante la reducción de temperatura (Salomon y Maxwell, 2000). Sin embargo, otra proteína presente en la leche, la lactenina, es tóxica para los espermatozoides, por lo que se recomienda calentar la leche previamente. Excepto en el caso de la leche UHT, las demás formas de leche han de ser calentadas hasta una temperatura de +92°/+95 °C durante 8- 10 minutos, sin llegar a hervir (tindalización), con el objetivo de anular los factores tóxicos de su fracción proteica (Maxwell y Evans, 1990).

➤ **Yema de huevo**

La yema de huevo es un componente básico que está presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación. Se ha usado bien sola o combinada con citrato de sodio o amortiguadores orgánicos en la leche calentada o descremada, y ha sido probada en especies como toro, carnero, macho cabrío, verraco, garañón, camélidos y especies silvestres (Hafez, 2002). Los huevos han de ser frescos, no transcurriendo más de 4 días desde la puesta hasta el momento de su utilización (Maxwell y Evans, 1990).

La acción protectora de la yema de huevo ha sido atribuida a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Moussa *et al.*, 2002), que evitan el choque térmico y preservan la integridad de la membrana (Watson, 1981). Las LDL están compuestas por 87% de lípidos y 12% de proteínas, y presentan una forma esférica con un centro formado por triglicéridos los que están rodeados por una envoltura de proteínas y fosfolípidos (Hu *et al.*, 2010).

Se postula que durante la congelación- descongelación, las LDL son desbaratadas y los fosfolípidos son liberados en el medio, y vendrían a formar una cubierta protectora en la superficie de las células espermáticas (Hu *et al.*, 2010).

➤ **Azúcares**

Para proveer de energía al espermatozoide, los dilutores de semen deben incluir azúcares del tipo monosacáridos. Siendo la principal fuente de energía la fructosa; sin embargo, los espermatozoides también pueden metabolizar otros monosacáridos como la glucosa y manosa (Hafez, 2002).

Chen *et al.* (1993) aseveran que las membranas de los espermatozoides de toro son impermeables a los disacáridos, pudiendo causar remoción parcial del agua del

espermatozoide, y así reducir la posibilidad de formación de hielo intracelular. En esta investigación los azúcares trehalosa y sucrosa causaron pequeñas mejoras en la supervivencia durante el proceso de congelación y descongelación.

➤ **Sustancias amortiguadoras**

El pH ideal para los dilutores debe ser neutro, es decir de 7.0, aunque se aceptan valores que vayan de 6.5 a 7.5, ya que los espermatozoides no sufren ninguna alteración dentro de este parámetro (Salomon y Maxwell, 2000). Para lograr los valores ya mencionados de pH, se han utilizado al paso del tiempo sustancias amortiguadoras o búfers como el citrato, fosfato y tris, con ventajas para este último (Illera, 1994).

➤ **Antibióticos**

La contaminación bacteriana puede afectar negativamente la fertilidad, por la propia presencia de bacterias, producción de toxinas, degradación de los componentes del medio o por la utilización de sustratos metabólicos (Silva y Silva, 2012). Esta situación justifica la necesidad de incorporar a los dilutores sustancias de efecto antimicrobiano. Hay una gran variedad de antibióticos disponibles para estos fines, pero los mayormente utilizados y sus cantidades contenidas en los dilutores para semen de rumiantes son 1000 UI/ml de penicilina y 1 mg/ml de estreptomicina (Salomon y Maxwell, 2000).

2.7.2.2. AGENTES CRIOPROTECTORES

El proceso de criopreservación ideal debe preservar, en la mayor proporción posible, la integridad de las diferentes estructuras del espermatozoide. La utilización de un agente crioprotector es indispensable en la minimización de los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Gao *et al.*, 1995); pues los crioprotectores tienen efectos notables sobre los fenómenos que acompañan a la

congelación y la descongelación de las células vivas, proporcionando protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras celulares y extracelulares y en la composición química (Fahy *et al.*, 1990).

Los agentes crioprotectores se han clasificado según su capacidad para atravesar la membrana:

➤ **Crioprotectores no penetrantes:**

Son aquellos que al ser incorporados en el medio de dilución recubren la membrana plasmática del espermatozoide protegiendo su estructura de la acción del frío. No atraviesan la membrana espermática debido a su alto peso molecular o especificidad y son efectivas cuando se utilizan a velocidades altas de congelación (Boiso, 2001). Destacan por su utilización los azúcares (glucosa, lactosa y fructosa), las proteínas de la leche descremada y yema de huevo (Salomon y Maxwell, 1995).

➤ **Crioprotectores penetrantes:**

Son aquellos capaces de penetrar en la célula de forma uniforme evitando el estrés osmótico, produciendo deshidratación celular por la sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de la concentración de solutos del medio extracelular e impidiendo la formación de cristales de hielo en el interior (Medeiros *et al.*, 2002). Protegen a las células de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta (García y Vila, 1984). Destacan por su utilización el glicerol, dimetil sulfoxido, propilenglicol, etilenglicol, metanol y etanol.

■ **Glicerol**

El glicerol (GI) es el crioprotector más utilizado en los protocolos de congelación de semen de prácticamente todas las especies domésticas. Esta sustancia ocupa simultáneamente la membrana y los compartimentos extra e intracelulares (Mazur,

1984), pero su principal efecto crioprotector se ejerce a nivel extracelular (Amann y Pickett, 1987). Su función a este nivel consiste en aumentar el volumen del medio extracelular y la proporción de agua en estado de no congelación, haciendo disminuir las concentraciones de los electrolitos y por tanto, minimizando los efectos de solución (Mazur, 1984); además, y mediante la estimulación osmótica de la deshidratación celular, consigue disminuir el volumen del agua intracelular disponible para congelarse (Medeiros *et al.*, 2002). Los efectos sobre la osmolaridad celular no son los únicos, el Gl también parece ejercer un efecto directo en la membrana plasmática (Parks y Graham, 1992).

Sin embargo, a pesar de que el Gl protege las membranas del espermatozoide durante la criopreservación, también ejerce una cierta toxicidad celular que afecta a la membrana plasmática (Hammerstedt *et al.*, 1990). Las alteraciones resultantes pueden mermar la fertilidad del espermatozoide, aunque tenga motilidad tras la descongelación (Watson, 2000). Los efectos tóxicos del Gl comprenden alteraciones de: -las características físicas del citoplasma, en su organización y viscosidad, -la permeabilidad y la estabilidad de la membrana plasmática, -la unión no-covalente de las proteínas a la superficie del espermatozoide, y -el metabolismo y equilibrio bioenergético (Hammerstedt y Graham, 1992). Es probable que el glicerol influya en la reorganización de los fosfolípidos y de las proteínas de la membrana plasmática y, de este modo, afecte al potencial de fusión de la membrana (Amann y Pickett, 1987). Sin embargo, el Gl es perjudicial para las estructuras del espermatozoide en distintos grados, pareciendo que las membranas de las mitocondrias están más afectadas que las membranas acrosomales y plasmática (Garner *et al.*, 1999).

La sensibilidad a los efectos tóxicos del Gl varía considerablemente con la especie. Por ejemplo, la susceptibilidad del espermatozoide de cerdo, principalmente para las lesiones acrosomales, puede justificar la baja fertilidad del espermatozoide descongelado en esta especie, cuando se compara con especies más resistentes como el toro (Curry, 2000).

También en los estudios de Cardoso *et al.* (2003) con un diluyente de agua de coco, los porcentajes de 4, 6 (0.822 M) y 8% han proporcionado buenos resultados en la motilidad post descongelamiento, con porcentajes de 49.2, 44.2 y 35.8 % respectivamente. Mientras, otros estudios sugieren que la motilidad post descongelación es superior con Gl a 8 % que a 2, 4 o 6 % (Peña *et al.*, 1998). Por otro lado, Holt (2000) indica que los espermatozoides bovinos son habitualmente criopreservados con concentraciones de 4 - 8 % de Gl, y estas concentraciones se han utilizado con éxito para criopreservar espermatozoides de algunos rumiantes salvajes y primates. Sin embargo, otras especies (cerdos y los ratones) no toleran concentraciones superiores al 3 % (0.411 M) y 1.75 % (0.239 M), respectivamente.

La supervivencia del espermatozoide descongelado puede estar influenciada por el modo en que el Gl es adicionado antes de la congelación (Fiser y Fairfull, 1989) y por cómo es eliminado tras la descongelación, ya que ambas operaciones pueden crear un considerable estrés osmótico, resultando en daños celulares (Gao *et al.*, 1995). El estrés osmótico está relacionado con las diferencias en la permeabilidad relativa al Gl y al agua de la membrana plasmática. Tras la exposición a un soluto permeable, como es el caso del glicerol, el espermatozoide se encoge debido a la pérdida del agua y después se hincha, así que el agua y dicho soluto permeable entran en la célula. Cuando estas células se suspenden en un medio isoosmótico, inicialmente se hinchan ya que el agua entra en la célula y después encogen debido a que tanto el agua y como el soluto se mueven hacia el exterior de la célula (Ball y Vo, 2001).

La motilidad y la integridad de la membrana parecen estar afectadas de modo distinto por el estrés osmótico, así que la motilidad es mucho más sensible a las condiciones anisoosmóticas que la integridad de membrana, especialmente en condiciones hipotónicas frente a hipertónicas (Gao *et al.*, 1995).

Tras la exposición a condiciones de estrés hipo-osmótico, los daños en el espermatozoide no revierten por la exposición posterior a condiciones isoosmóticas, ya que la motilidad no mejora después del restablecimiento de la osmolaridad normal. Además, el potencial de membrana de las mitocondrias está afectado por las situaciones de estrés osmótico. Por tanto, las lesiones en la membrana plasmática y en las mitocondrias pueden estar asociadas al declive de la motilidad observado en el estrés osmótico (Ball y Vo, 2001). La tolerancia osmótica relativa del espermatozoide parece diferir entre especies, dado que la capacidad relativa del espermatozoide para sobrevivir al estrés osmótico está relacionada, en parte, con la capacidad del espermatozoide para sobrevivir a la criopreservación (Wessel y Ball, 2004).

La adición de Gl y la pérdida intracelular de agua durante la congelación reducen casi a la mitad el volumen (isotónico) del espermatozoide mientras que durante la descongelación, cuando se suspende en una solución isotónica, la célula expande 2 veces su volumen (Parks y Graham, 1992). Hammerstedt *et al.* (1990) proponen un mecanismo de acomodación del volumen de la membrana a través de la formación de pliegues hacia el interior (invaginación) y exterior (evaginación). El Gl puede ser nocivo durante la descongelación, ya que, al contrario de lo que ocurre en la refrigeración y congelación; el Gl se desplaza del interior hacia el exterior de la célula. Cuando la permeabilidad de la membrana es insuficiente, para acomodar este movimiento, resultan daños permanentes que estarán seguramente exacerbados cuando el espermatozoide se coloca en el tracto genital femenino, que es hipoosmótico frente al diluyente (Amann y Pickett, 1987).

Algunos autores sostienen que más que la rápida adición del Gl es su rápida eliminación lo que origina mayores daños a las células, observándose disminución en la viabilidad, motilidad y potencial de las membranas mitocondriales; lo que fue observado en el espermatozoide fresco equino (Ball y Vo, 2001).

En conclusión, la concentración óptima del Gl puede ser influenciada por los componentes del dilutor, las tasas de refrigeración, los métodos de congelación y descongelación, pero el principal factor involucrado son las características del semen de cada especie (Watson, 1979).

■ **Dimetilsulfoxido (DMSO)**

Los efectos toxicos del glicerol han impulsado el uso de otros crioprotectores como el DMSO, que es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; su acción crioprotectora consiste en prevenir la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y evita la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana celular, además modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación del agua (Ávila – Portillo *et al.*, 2006).

Al comparar diferentes concentraciones de DMSO y Gl, Wei *et al.* (2004) encontraron que el DMSO a concentraciones de 2 % (0.280 M), 5 % (0.701 M), 10 % (1.402 M), 15 % (2.103 M) fue inferior al 5 % de Gl para criopreservar la motilidad y la integridad de membrana plasmática y acrosomal del mono Rhesus. En contraste, Feradis *et al.* (2001) encontraron que el Gl y el DMSO al 6 % (0.84 M) produjo tasas similares de supervivencia de los espermatozoides de mono cynomolgus después de la criopreservación. Esta diferencia puede deberse a las diferencias entre espermatozoides de epidídimo y eyaculados. El efecto aditivo del Gl en combinación con DMSO sobre la calidad espermática post descongelación ha sido reportado en el semen de peces (Lahnsteiner *et al.*, 2000) y conejos (Bamba y Adams, 1990).

■ Etilenglicol

El etilenglicol (EG) es un polialcohol, cuyo peso molecular (62.07) es inferior al del glicerol (92.10), una característica que podría resultar en una menor toxicidad y alta permeabilidad celular (Massip, 2001).

En la congelación del semen de toro el EG (1 M) ha ejercido un menor efecto inhibitorio en la motilidad que el Gl o el DMSO en la misma concentración (Guthrie *et al.*, 2002), reduciendo la extensión de las lesiones osmóticas, por lo que podría considerarse como un crioprotector alternativo al Gl. En el semen ovino, el EG utilizado a concentraciones entre el 1,5 (0.269 M) y el 6 % (1.078 M) ha proporcionado buenos porcentajes de motilidad post descongelación (Molinia *et al.*, 1994).

En la congelación del espermatozoide equino, Mantovani *et al.* (2002) consideran, basándose en los valores de la motilidad progresiva del espermatozoide descongelado, que el EG podría sustituir al glicerol si se utiliza en la misma concentración que éste (3 % (0.539 M)), o incluso más reducida. Asimismo, los trabajos de Henry *et al.* (2002) en esta especie lo han sugerido, y además puntualizan que el EG, solo o en combinación con glicerol, ha proporcionado buenos resultados en la motilidad progresiva y en la preservación de la integridad de la membrana del espermatozoide y del acrosoma.

La posibilidad de que el EG provoque menores “lesiones” osmóticas que otros crioprotectores en el espermatozoide equino, considerado como un espermatozoide con limitada capacidad de tolerancia a condiciones aniso-osmóticas, tendría como consecuencia un menor perjuicio para la motilidad y la viabilidad tras la descongelación; hecho también observado por Ball y Vo (2001).

2.7.3. FACTORES Y ALTERACIONES DE LA CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a bajas temperaturas (Ávila- Portillo *et al.*, 2006). Sin embargo, este no esta exento de problemas ya que puede inducir modificaciones en la propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula- célula inherente en las células y tejidos criopreservados (Woods *et al.*, 2004).

Durante los procesos de congelación y descongelación, los espermatozoides sufren varios ciclos de deshidratación e hidratación originando cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen ocurre cuando el espermatozoide es colocado dentro de un dilutor, el cual contiene sustancias crioprotectoras, para ser congelado. Posteriormente, ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada. Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y electrólitos en las soluciones intra y extra celular. La forma en que ocurren estas modificaciones determinan la mayor o menor capacidad del espermatozoide para soportar el daño al que se ve sometido (Stornelli *et al.*, 2005).

Por otro lado el choque térmico y las lesiones irreversibles asociadas resultan de alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana del espermatozoide o fases de transición lipídica (Drobnis *et al.*, 1993). La reorganización de los lípidos perturba principalmente las asociaciones normales lípido- lípido y lípido- proteína que son imprescindibles para una función normal de la membrana (Parks y Graham, 1992). La disposición anormal de los fosfolípidos puede permitir la rápida entrada de moléculas que en situaciones normales atravesarían la membrana lentamente (Amann y Pickett, 1987). Tras la descongelación, la capacidad de fusión y las respuestas de la membrana a las señales de transducción pueden también verse alteradas, lo que conduce a la capacitación precoz y, en consecuencia, a la reducción de la longevidad del espermatozoide tras la descongelación (Watson, 1995).

Los principales daños celulares inducidos por la refrigeración incluyen las siguientes alteraciones morfológicas: - Ruptura de la membrana plasmática, - Degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias (De Leeuw *et al.*, 1990) y - Pérdida de las propiedades de selectividad en la permeabilidad de la membrana (Parks y Graham, 1992).

En cuanto a los daños sufridos tras la congelación, los más sensibles son las membranas plasmática y acrosomal que el núcleo y que la porción intermedia; y respecto al acrosoma, la membrana externa es más vulnerable que la membrana interna (Salamon y Maxwell, 1995).

Las lesiones en el acrosoma ya empiezan a evidenciarse tras la dilución, refrigeración y equilibrio, pero son más marcadas tras la descongelación. Los daños acrosomales, incluyendo la región ecuatorial, se manifiestan por la vesiculación acrosómica (reacción acrosómica falsa) o por degeneración celular. En la reacción acrosómica falsa existe una pérdida del acrosoma debido a la desintegración de las membranas acrosomal y plasmática durante la muerte celular y en consecuencia estos espermatozoides pierden la capacidad de fertilizar ovocitos (Way *et al.*, 1995).

2.7.4. CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN CAMÉLIDOS

La criopreservación de semen en camélidos, es una herramienta valiosa para el mejoramiento genético, ya que abriría la posibilidad para la creación de un banco de germoplasma que junto con la inseminación artificial (IA) permitiría la difusión del material genético superior a lugares donde es difícil el acceso o no se cuenta con el reproductor cerca y a la vez permitiría el uso de este material genético por muchos años incluso después de la muerte del reproductor. Además permitiría concentrar toda la variabilidad genética de las alpacas de color, que por influencia del mercado externo en la demanda de fibra blanca ha ocasionado el blanqueo de los animales y por ende la disminución de las alpacas de color contribuyendo a su próxima desaparición (Huanca *et*

al., 2013). Asimismo aseguraría una reserva genética de especies por el peligro de extinción, como la vicuña, el guanaco y el camello bactriano.

Aunque existe un considerable interés en la aplicación de la IA con semen congelado en los camélidos, esta se limita debido a que la criopreservación del semen no ha sido suficientemente desarrollada y no se cuenta con mucha información al respecto. Algunas razones incluyen la dificultad en la colección de semen, la alta viscosidad seminal, la reducida concentración espermática y la gran cantidad de espermatozoides anormales que se encuentran en la mayoría de los eyaculados (Bravo *et al.*, 1997b). Por ello, los espermatozoides epididimarios podrían servir como un buen modelo experimental para el desarrollo y refinamiento de los protocolos de criopreservación de semen, ya que se encuentran en un nivel de maduración final y no están mezclados con el plasma seminal viscoso, además el manejo de las muestras es fácil (Canorio, 2008). También es importante enfatizar que existen factores externos al semen que pueden influenciar la eficiencia de la criopreservación espermática, como es el dilutor, el tipo y concentración del crioprotector, la velocidad de congelación y descongelación, entre otros (Watson, 1990).

En cuanto a la criopreservación espermática en alpacas, se ha reportado el uso de distintos dilutores como Lactosa, Biladyl®, Triladyl®, Androhep®, Citrato, TES TRIS y leche descremada, siendo los dos últimos los más comúnmente utilizados; en estos estudios se han obtenido motilidades post descongelamiento variables de 0 – 31% (Valdivia *et al.*, 1999; Santiani *et al.*, 2005; Ordoñez y Verastegui, 2007; Morton *et al.*, 2010; Banda *et al.*, 2010; Choez *et al.*, 2013; Terreros *et al.*, 2015) tanto para espermatozoides eyaculados como para los obtenidos de la cola del epidídimo. Al parecer no existirían diferencias en motilidad al trabajar con espermatozoides obtenidos del epidídimo con o sin plasma seminal (Rodríguez, 2009), lo que podría justificar el uso de estos espermatozoides como una alternativa para investigar las bases del proceso de congelación y descongelación (Morton *et al.*, 2008).

Por otro lado, el crioprotector más utilizado en la criopreservación de espermatozoides de alpacas es el glicerol; el cual ha sido empleado en concentraciones de 2 - 4% (0.27- 0.55

M) (Morton *et al.*, 2010), 6% (0.82 M) (Banda *et al.*, 2010), 7% (0.96 M) (Santiani *et al.*, 2005; Terreros *et al.*, 2015) y 8 % (1.09 M) a 10 % (1.36 M) (Ordoñez y Verastegui, 2007); sin embargo debido a los efectos tóxicos del glicerol (Hammerstedt y Graham, 1992; Amann y Pickett, 1987; Garner *et al.*, 1999) se han experimentado con otros agentes crioprotectores como el etilenglicol, DMSO y DMA. Con respecto a las concentraciones de etilenglicol se han usado en 1% (0.2 M) (Banda *et al.*, 2010), 0.7% (0.125 M) (Santiani *et al.*, 2005), 7% (1.25 M) (Terreros *et al.*, 2015) y 8 % (1.43 M) a 10 % (1.80 M) (Ordoñez y Verastegui, 2007). Mientras que las concentraciones de DMSO utilizadas fueron de 0.9 % (0.125 M), 1.8% (0.25 M) y 3.5 % (0.5 M) (Canorio, 2008) y 7 % (0.98 M) (Terreros *et al.*, 2015) y por último las concentraciones de DMA empleadas han sido de 1.7 % (0.18 M), 3.5 % (0.375 M) y 7 % (0.75 M) (Canorio, 2008; Rodriguez, 2009; Banda *et al.*, 2010; Mancisidor, 2013). En todos los estudios antes mencionados, a pesar de los grandes esfuerzos aún no se ha reportado el tipo y concentración ideal del crioprotector o crioprotectores, que permita obtener mayores motilidades post descongelamiento de las que actualmente se obtienen de alrededor del 30% en el mejor de los casos, esto podría deberse a que los crioprotectores son altamente especie- específicos y su efectividad varía en función de la concentración utilizada.

Adicionalmente, el proceso de criopreservación no solo provoca alteraciones en la motilidad espermática, sino que también puede producir alteraciones en la membrana plasmática, el acrosoma y el ADN espermático. Al respecto Santiani *et al.* (2013) reportaron que el uso de análogos de la enzima superóxido dismutasa “SOD” (Tempol o Tempo, 1 mM) previene la disminución de la motilidad espermática, la integridad funcional de la membrana plasmática y la fragmentación del ADN espermático luego del proceso de criopreservación; sin embargo el porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas intactos no fue afectado por la adición de los análogos de SOD.

Finalmente, vale la pena resaltar que para realizar la IA, se sugiere emplear una motilidad espermática post descongelamiento alrededor del 80 % en la mayoría de las especies, empero, se ha logrado obtener preñeces de 30 días en alpacas con valores de motilidad del 17% de espermatozoides criopreservados con glicerol (Ordoñez *et al.*, 2013). Por otra parte; en fecundación *in vitro*, Terreros *et al.* (2015) lograron obtener un porcentaje de división de

ovocitos del 46.6 y 26.6 % con espermatozoides criopreservados con 7% de DMSO y glicerol respectivamente.

En referencia a la criopreservación espermática en llamas, utilizando dilutores a base de Tris, EDTA y Lactosa se han obtenido resultados que varían de 10 a 45 % de motilidad post descongelamiento (Graham *et al.*, 1978; McEvoy *et al.*, 1992; Aller *et al.*, 2003). Entre los crioprotectores que se han usado figuran el glicerol en la mayoría de veces, el DMSO y la dimetilformamida (DMF) que recientemente ha sido reportada en la criopreservación de semen de llamas (Carretero *et al.*, 2013). A propósito en este estudio se concluye que la DMF al 7% conservaría mejor la motilidad, viabilidad e integridad funcional de los espermatozoides de llama a comparación del glicerol al 7%.

Acerca de la criopreservación espermática en camellos bactrianos, Niasari-Naslaji *et al.* (2007) comparando 4, 6 y 8 % de glicerol, obtuvieron motilidades post descongelamiento 35 % cuando el dilutor a base de tris contenía 6% de glicerol. Estos resultados concuerdan con el estudio de Zhao *et al.* (1996), quienes concluyeron que la concentración final de glicerol 7% fue superior a 3,5%. Sin embargo, la concentración de 3 % de glicerol se ha utilizado con éxito para la criopreservación de semen de camello dromedario (Deen *et al.*, 2003).

Cuadro 4. RESULTADOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Referencia	Año	Especie	Muestra	Dilutor/crioprotector	Motilidad (%)		Integridad membrana plasmática (%)		Viabilidad/integ acrosomal (%)	
					Fresco	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado
Mancisidor	2013	Alpaca	Epidídimo	Tes-otocoferol-DMA 3.5 %	66.7	32.47	74.81	44.5	70.4	28.73
Terreros <i>et al.</i>	2015	Alpaca	Epidídimo	Leche- glicerol 7%	68.89	23.89	53.93	26.4		
				Leche- etilenglicol 7%		8.33		17.82		
				Leche- DMSO 7%		31.11		28.69		
Morton <i>et al.</i>	2010	Alpaca	Epidídimo	Lactosa -glicerol 2%	52.7	16.1			89.3	83.6
				Lactosa -glicerol 3%		20.5				81.3
				Lactosa -glicerol 4%		18.5				84.8
				Biladyl	53	14.4			92.3	89.6
				Biladyl-Equex		21.5				91.1
Banda <i>et al.</i>	2010	Alpaca	Epidídimo	Tris-glicerol 6%	31.3	14	34.5	24.3		32.6
				Tes-DMA 3.5%		8.6		19.1		26.3
				Leche-etilenglicol 1%		17		17.9		27.2
Rodríguez	2009	Alpaca	Epidídimo	Tes-DMA	21.2	13.59	89.08	52.01	80.94	21.99
				Tes-DMA-Plasma Seminal		16.31		53.34		21.4
				Tes-DMA-Plasma Seminal denat		11.68		45.04		22.67
Canorio	2008	Alpaca	Epidídimo	Yolkcitrato-DMSO 1.8%	42.26	33.45	63.15	52.19		
				Yolkcitrato-DMA 3.5%		34.42		60.28		
Morton <i>et al.</i>	2007	Alpaca	Epidídimo	Citrato-glicerol 3%	46.9	6.9			90.6	86.4
				Lactosa-glicerol 3%		18.2				90.5
				Tris-glicerol 3%		11.3				92.4
Ordoñez y Verastegui	2007	Alpaca	Semen	Tris-glicerol 8%		31.93				
				Tris-etilenglicol 10%		4.36				

Cuadro 4. RESULTADOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

(continuación)

Referencia	Año	Especie	Muestra	Dilutor/crioprotector	Motilidad (%)		Integridad Mb plasmática (%)		Viabilidad/integ acrosomal (%)	
					Fresco	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado
Santiani <i>et al.</i>	2005	Alpaca	Semen	Leche-etilenglicol 0.7%	72	20			78.3	18.7
				Leche-glicerol 7%		15.3				12.7
				Tris-glicerol 7%		4				5.7
				Tris-etilenglicol 0.7%		1				4
Valdivia <i>et al.</i>	1999	Alpaca	Semen	Glicerol-yema	60-98	15-19				
Bravo <i>et al.</i>	1996	Alpaca	Semen	Citrato-yema	80	30-39				
Carretero <i>et al.</i>	2014	Llama	Semen	Lactosa- EDTA- yema - glicerol 7%	13.7	3.2	30.4	25.6		
				Lactosa- EDTA- yema	13.7	22.5	30.4	24.2		
				Dimetilformamida 7%						
Aller <i>et al.</i>	2003	Llama	Semen	Citrato- glicerol	54.3	20.4				
von Baer y Hellemann	1999	Llama	Semen	Tris		26.8				
				Tris-equex		25				
Mc Evoy <i>et al.</i>	1991	Llama	Semen	Tris-yema-glicerol		10				
Graham <i>et al.</i>	1978	Llama	Semen		50	45				

(Datos de artículos publicados en semen/espermatozoides de camélidos sudamericanos)

III.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN Y PERIODO DE DURACIÓN

En el presente estudio, las muestras fueron obtenidas del Camal Municipal de Huancavelica y el procesamiento de estas se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La fase experimental tuvo una duración de 10 meses.

3.2. MUESTRA DE ESTUDIO

Se realizó un cálculo de tamaño muestral para comparación de dos medias, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$n = \frac{2 (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

Donde:

n = sujetos necesarios en cada una de las muestras

Z_{α} = Valor Z correspondiente al riesgo deseado

Z_{β} = Valor Z correspondiente al riesgo deseado

S^2 = Varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia.

d = Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar

Para los experimentos 1, 2 y 3:

$$n = \frac{2 (1.645 + 1.036)^2 * 10^2}{20^2} = 3.59$$

El cálculo del tamaño muestral resultó de 3.59, pero se decidió trabajar con 5 epididimos por cada uno de los tres experimentos.

Para el experimento 4:

$$n = \frac{2 (1.645 + 1.036)^2 * 10^2}{12^2} = 9.98$$

El cálculo del tamaño muestral resultó de 9.98, pero se decidió trabajar con 12 epididimos.

La muestra de estudio estuvo constituida por 27 epididimos, obteniéndose un total de 168 repeticiones. Cabe mencionar que cuando se recolectaron dos epididimos de un mismo animal, se realizó un “pool de espermatozoides”, el que se utilizó de forma equitativa en los tratamientos.

Los epididimos provenían de alpacas machos adultos mayores a 3 años de edad, los que fueron seleccionados en base a la identificación dentaria, antes del sacrificio. Además se incluyeron en el estudio solo los epididimos que pertenecieron a testículos de 3.5 - 4 cm de largo y 2- 2.5 cm de ancho. Es preciso señalar que en todos los experimentos se utilizaron epididimos que tuvieron una concentración mayor a 70×10^6 espermatozoides por mililitro y un porcentaje de motilidad espermática mayor o igual al 60 %, como ha sido reportado por Choez *et al.* (2013), quienes concluyeron que los epididimos que tienen una motilidad inicial mayor a 60 %, logran mejores porcentajes de motilidad después del descongelamiento en comparación con las muestras que inician con motilidades menores a 60 %. La colecta de los testículos/epididimos fueron realizadas una vez cada dos semanas, en el periodo comprendido entre Marzo a Julio del 2012 para los primeros 3 experimentos y entre Marzo a Julio del 2014 para el experimento 4. (anexo, Figura 1).

3.3. TRANSPORTE DE LOS TESTICULOS/ EPIDIDIMOS

La colección de los testículos/epidídimos se realizó inmediatamente después del sacrificio del animal. Seguidamente los testículos fueron diseccionados para liberarlos de la túnica albugínea y se colocaron en un recipiente conteniendo solución salina fisiológica al 0.9 %, luego estos recipientes fueron introducidos en una caja de tecnopor la cual contenía geles refrigerantes. El tiempo de transporte de los testículos/epidídimos desde su recolección del camal hasta su llegada al laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria para su respectivo procesamiento fue de 20 horas.

3.4. RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS

Con la ayuda de una tijera se separó la cola del epidídimo del testículo; una vez que la cola epididimaria fué liberada se realizó la remoción del tejido conjuntivo que la recubre utilizando una tijera y una pinza, luego se realizó el lavado de ésta con solución salina fisiológica al 0.9 % para remover la sangre y los contaminantes externos. Posteriormente, la cola epididimaria limpia fué colocada en una placa petri donde se le realizaron cortes seriados en su superficie con un bisturí para la recuperación de los espermatozoides epididimarios (figura 2), de acuerdo a lo descrito por Banda *et al.* (2010).

Durante este proceso, se agregó 1.5 ml del dilutor (leche descremada- yema de huevo- fructosa descrito por Santiani *et al.* (2005)) a 37 °C sobre la cola epididimaria, lo que permitió la salida de los espermatozoides. Finalmente, se recuperó todo el líquido de la placa Petri (dilutor con los espermatozoides epididimarios), él que fué colocado en una estufa a 37 °C por 5 minutos. Luego de este tiempo, se utilizó 0.5 ml para la evaluación de las características espermáticas iniciales y el 1 ml restante se mezcló con 3 ml más del dilutor, obteniéndose 4 ml los que fueron distribuidos equitativamente en 8 alicuotas de 0.5 ml cada uno de los tratamientos [T1 (0.00 M), T2 (0.25 M), T3 (0.50 M), T4 (0.75 M), T5 (1.00 M), T6 (1.25 M), T7 (1.50 M), T8 (1.75 M)] en los experimentos 1, 2 y 3.

Para el experimento 4, la obtención de los espermatozoides epididimarios fue la misma de los experimentos 1, 2 y 3, pero con la diferencia de que la dilución final con el dilutor fué distribuida equitativamente en 4 tratamientos de 1 ml cada uno [T1 (sin crioprotector), T2 (Concentración óptima de glicerol), T3 (Concentración óptima de etilenglicol), T4 (Concentración óptima de DMSO)].

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los experimentos 1, 2 y 3 tuvieron como objetivo determinar la concentración óptima de los crioprotectores: glicerol, etilenglicol y dimetil sulfoxido. Por otro lado, el experimento 4 tuvo como objetivo determinar cual de las concentraciones óptimas de los tres crioprotectores era la mejor. Acontinuación se detalla cada uno de los experimentos:

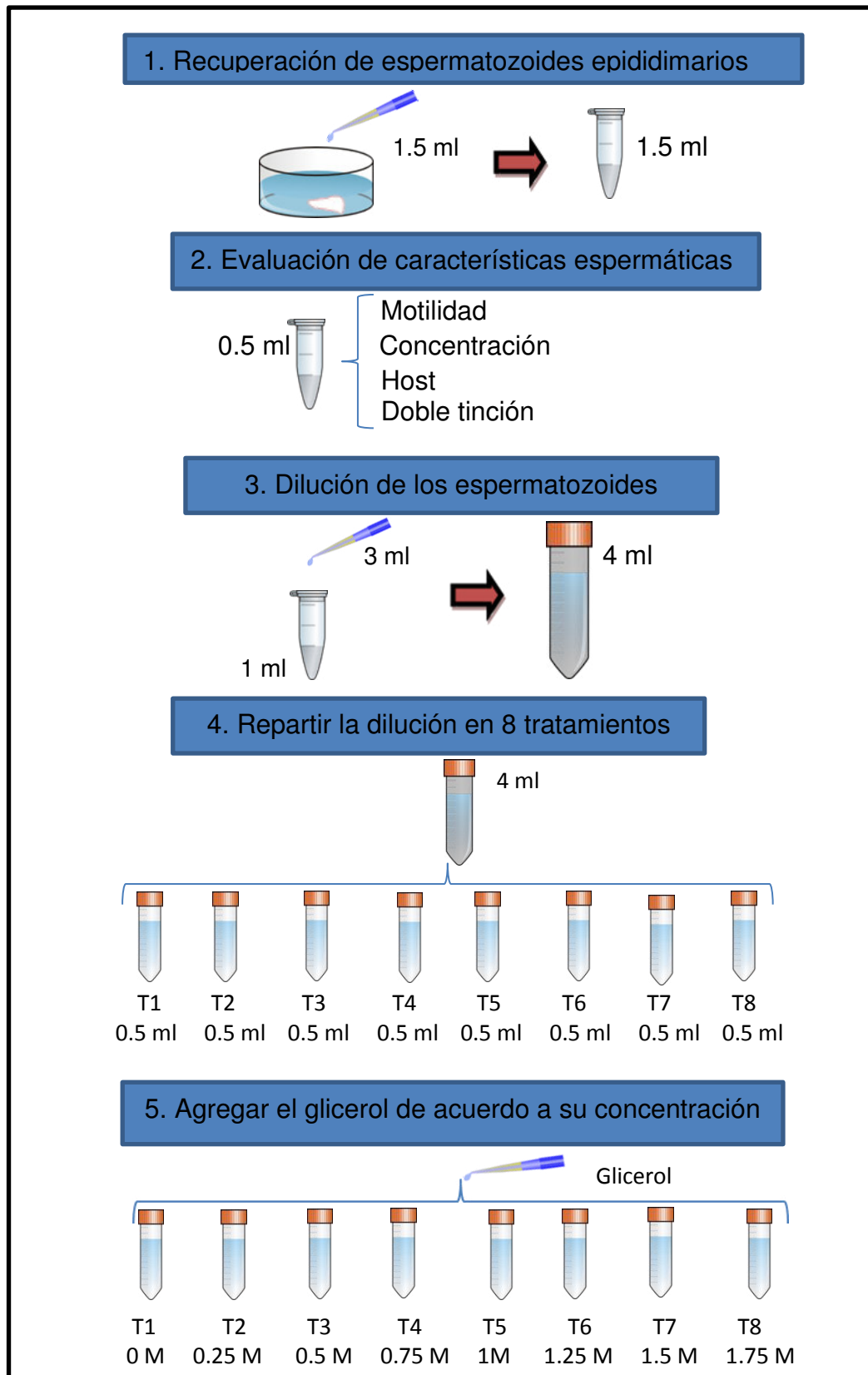
❖ Experimento 1: Determinación de la concentración óptima del glicerol para criopreservar espermatozoides epididimarios

Para este experimento, se obtuvieron un total de 40 repeticiones procedientes de 5 epididimos. Los espermatozoides epididimarios recuperados de un epidídimo se dividieron en 8 tratamientos de 0.5 ml para cada una de las diferentes concentraciones de glicerol (figura 3).

Los tratamientos estuvieron conformados de la siguiente manera:

- T1: Espermatozoides epididimarios congelados con glicerol 0.00 M.
- T2: Espermatozoides epididimarios congelados con glicerol 0.25 M.
- T3: Espermatozoides epididimarios congelados con glicerol 0.50 M.
- T4: Espermatozoides epididimarios congelados con glicerol 0.75 M.
- T5: Espermatozoides epididimarios congelados con glicerol 1.00 M.
- T6: Espermatozoides epididimarios congelados con glicerol 1.25 M.
- T7: Espermatozoides epididimarios congelados con glicerol 1.50 M.
- T8: Espermatozoides epididimarios congelados con glicerol 1.75 M.

Fig. 3 Esquema de distribución de los tratamientos con Glicerol



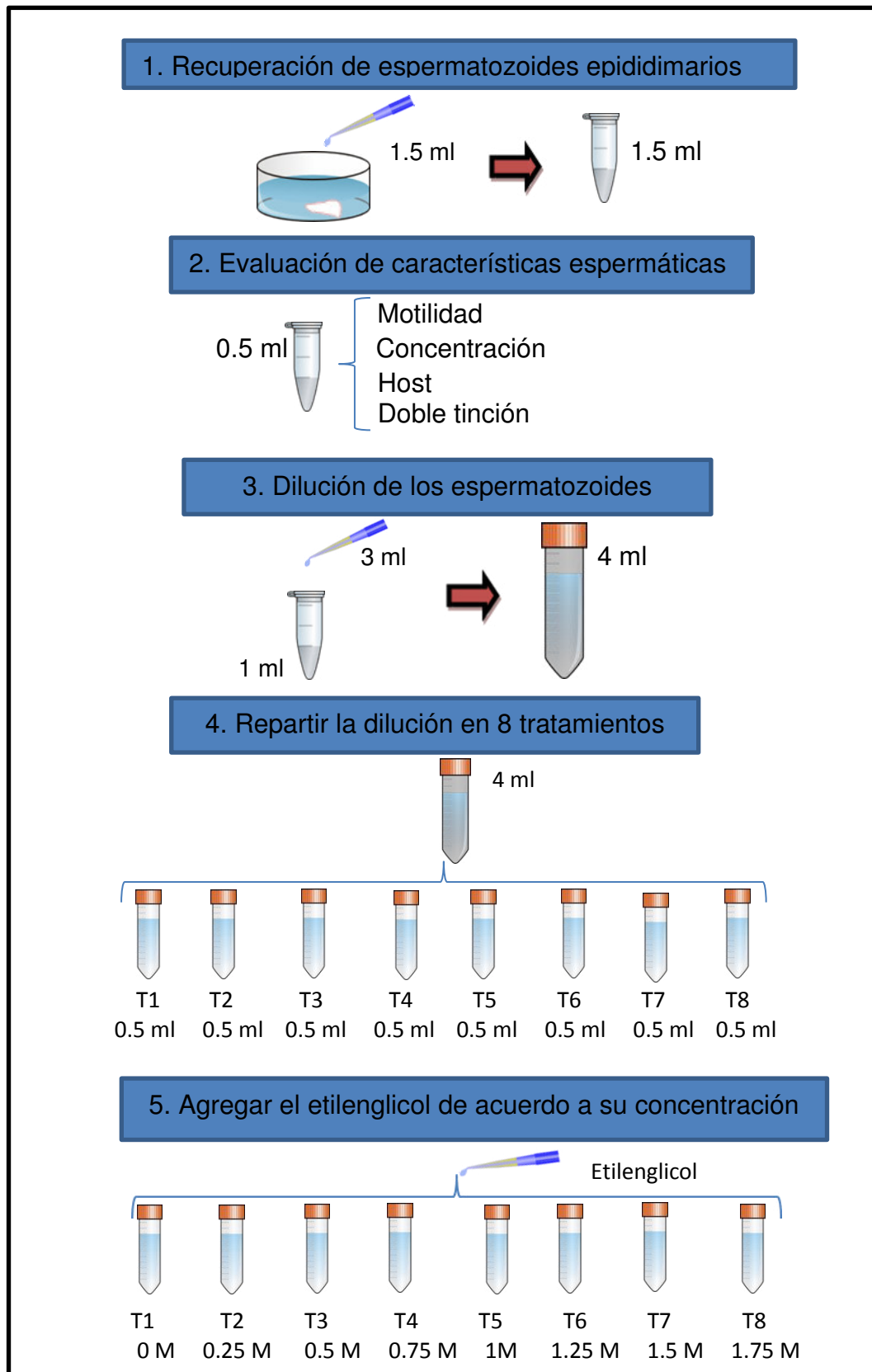
❖ Experimento 2: Determinación de la concentración óptima del etilenglicol para criopreservar espermatozoides epididimarios

Para este experimento, se obtuvieron un total de 40 repeticiones procedentes de 5 epididimos. Los espermatozoides epididimarios recuperados de un epidídimo se dividieron en 8 tratamientos de 0.5 ml para cada una de las diferentes concentraciones de etilenglicol (figura 4).

Los tratamientos estuvieron conformados de la siguiente manera:

- T1: Espermatozoides epididimarios congelados con etilenglicol 0.00 M.
- T2: Espermatozoides epididimarios congelados con etilenglicol 0.25 M.
- T3: Espermatozoides epididimarios congelados con etilenglicol 0.50 M.
- T4: Espermatozoides epididimarios congelados con etilenglicol 0.75 M.
- T5: Espermatozoides epididimarios congelados con etilenglicol 1.00 M.
- T6: Espermatozoides epididimarios congelados con etilenglicol 1.25 M.
- T7: Espermatozoides epididimarios congelados con etilenglicol 1.50 M.
- T8: Espermatozoides epididimarios congelados con etilenglicol 1.75 M.

Fig. 4 Esquema de distribución de los tratamientos con Etilenglicol



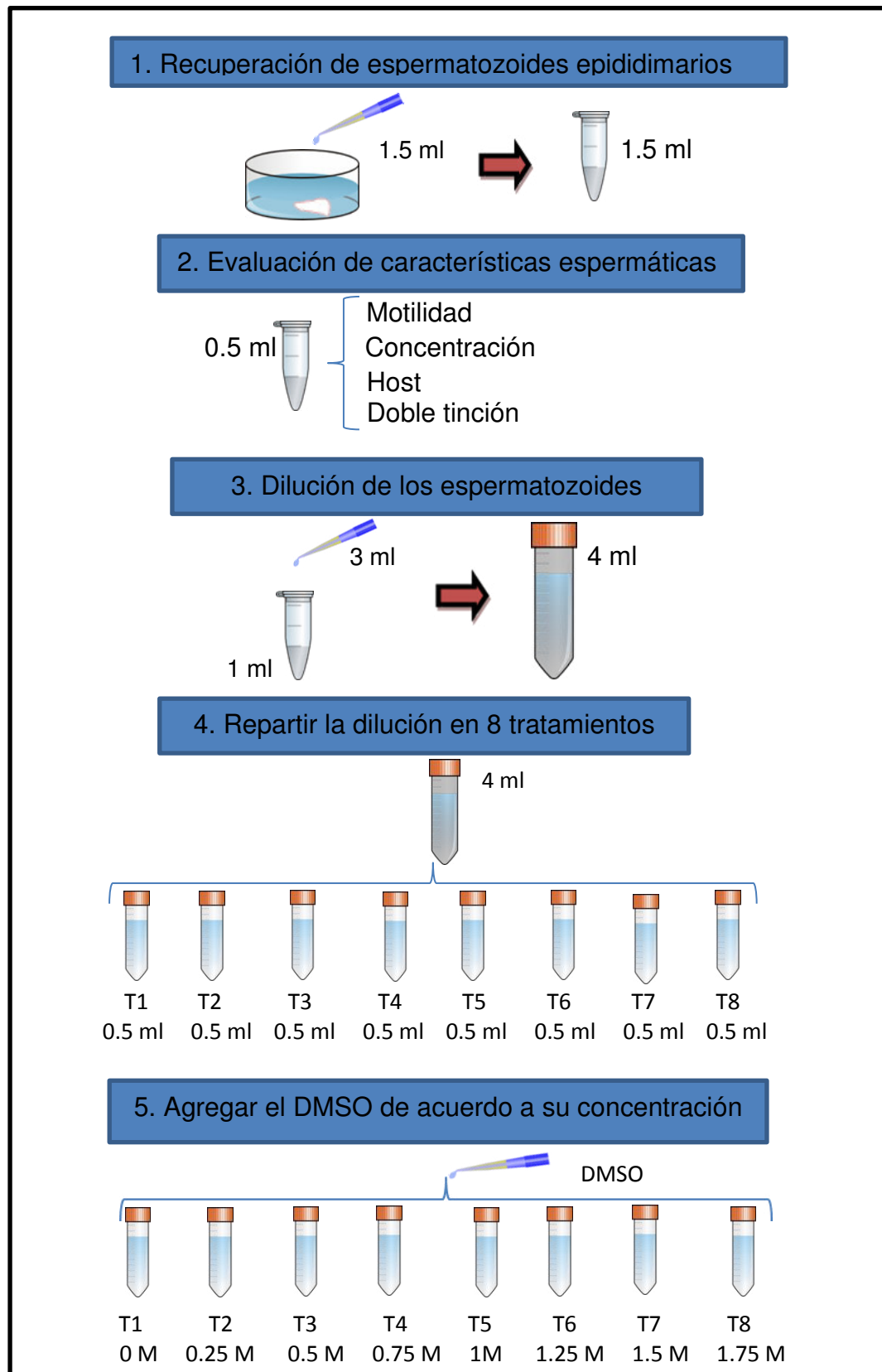
❖ Experimento 3: Determinación de la concentración óptima del dimetil sulfóxido para criopreservar espermatozoides epididimarios

Para este experimento, se obtuvieron un total de 40 repeticiones procedientes de 5 epididimos. Los espermatozoides epididimarios recuperados de un epidídimo se dividieron en 8 tratamientos de 0.5 ml para cada una de las diferentes concentraciones de dimetil sulfóxido (DMSO) (figura 5).

Los tratamientos estuvieron conformados de la siguiente manera:

- T1: Espermatozoides epididimarios congelados con DMSO 0.00 M.
- T2: Espermatozoides epididimarios congelados con DMSO 0.25 M.
- T3: Espermatozoides epididimarios congelados con DMSO 0.50 M.
- T4: Espermatozoides epididimarios congelados con DMSO 0.75 M.
- T5: Espermatozoides epididimarios congelados con DMSO 1.00 M.
- T6: Espermatozoides epididimarios congelados con DMSO 1.25 M.
- T7: Espermatozoides epididimarios congelados con DMSO 1.50 M.
- T8: Espermatozoides epididimarios congelados con DMSO 1.75 M.

Fig. 5 Esquema de distribución de los tratamientos con DMSO



❖ **Experimento 4: Comparación de la concentración óptima del glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido para criopreservar espermatozoides epididimarios**

Para este experimento, se obtuvieron un total de 48 repeticiones procedientes de 12 epididimos. Los espermatozoides epididimarios recuperados de un epidídimo se dividieron en 4 tratamientos de 1 ml cada uno (T1: sin crioprotector y T1, T2, T3 de acuerdo a la concentración óptima de glicerol, etilenglicol y DMSO determinadas en los tres experimentos previos, para establecer cuál agente crioprotector fue mejor) (figura 6).

Los tratamientos estuvieron conformados de la siguiente manera:

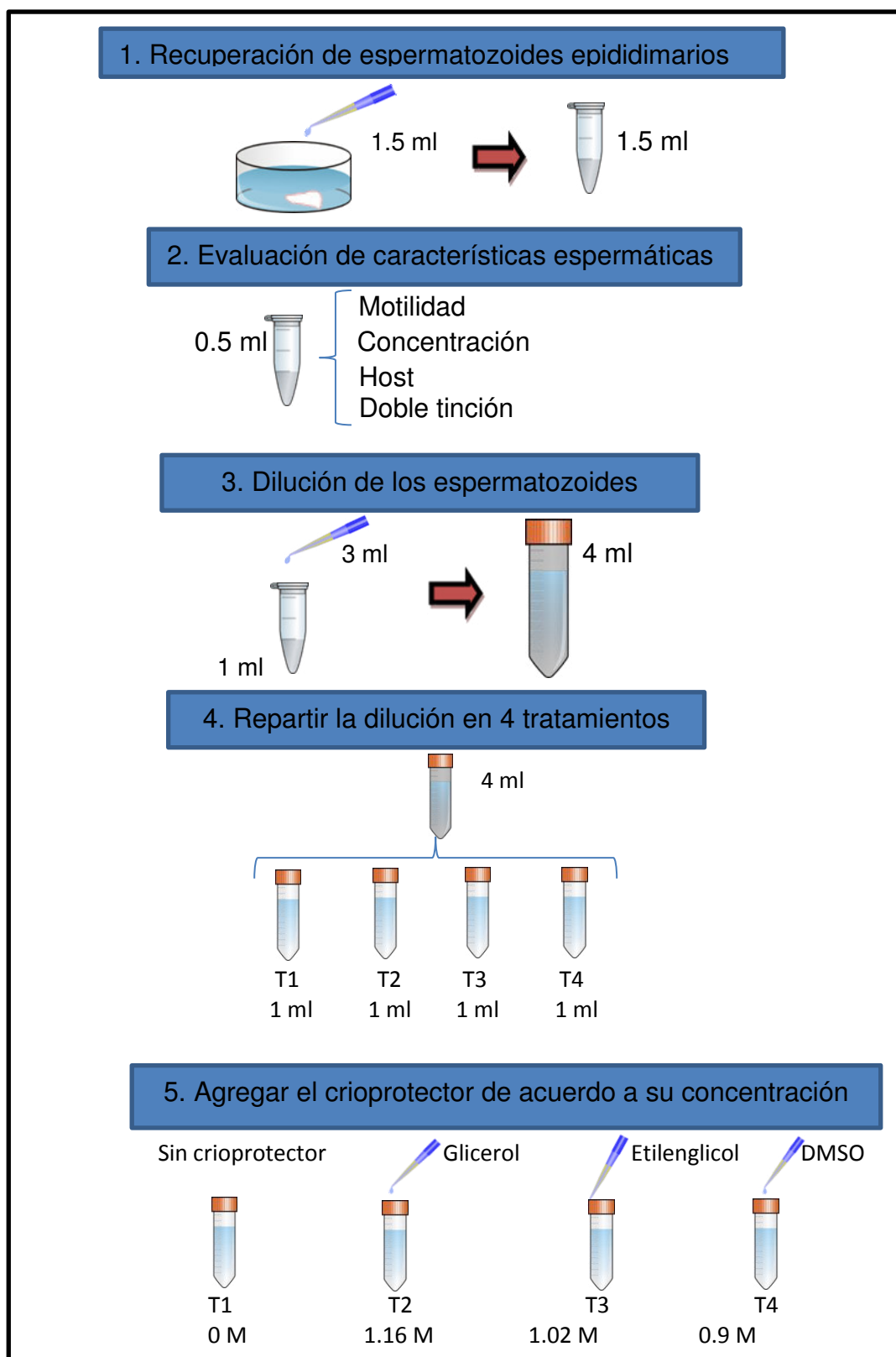
T1: Espermatozoides epididimarios congelados sin crioprotector.

T2: Espermatozoides epididimarios congelados con la concentración óptima de glicerol

T3: Espermatozoides epididimarios congelados con la concentración óptima de etilenglicol

T4: Espermatozoides epididimarios congelados con la concentración óptima de DMSO

Fig. 6 Esquema de distribución de los tratamientos con Glicerol, Etilenglicol y DMSO



3.6. DILUTOR Y CRIOPROTECTORES

Para los 4 experimentos, se usó el dilutor en base a leche descremada- yema de huevo-fructosa descrito por Santiani *et al.* (2005), el que consistió en 10 ml de leche fresca descremada UHT (Gloria S.A.), 5% v/v de yema de huevo y 0.485 g de D-(-) fructosa 99% (F0127- Sigma). Este dilutor se empleó para realizar la mezcla con los espermatozoides epididimarios, y para la curva de enfriamiento.

Asimismo se utilizaron los siguientes agentes crioprotectores para el procedimiento de congelación: glicerol (G5516- Sigma), etilenglicol (324558- Sigma) y dimetil sulfóxido (D5879- Sigma); la concentración final de los 3 agentes crioprotectores para los experimentos 1, 2 y 3 fue la siguiente: 0.00 M, 0.25 M, 0.50 M, 0.75 M, 1.00 M, 1.25 M, 1.50 M, 1.75 M. Finalmente, en el experimento 4 se utilizaron las concentraciones óptimas encontradas en los 3 primeros experimentos, en donde la concentración final del glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido fue de 1.16 M, 1.02 M y 0.90 M respectivamente.

3.7. CRIOPRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS EPIDIDIMARIOS

El proceso de criopreservación se realizó en el siguiente orden: curva de enfriamiento y congelación. Para los experimentos 1, 2 y 3 se utilizaron 8 tubos de vidrio correspondientes a los 8 tratamientos. Para la curva de enfriamiento, se colocó los 8 tubos en un recipiente con agua a 35 °C y este recipiente a su vez fué colocado en la refrigeradora para lograr bajar la temperatura de 35 °C a 5 °C en un tiempo aproximado de 150 minutos con una tasa de enfriamiento de 1 °C/5 minutos. Lograda esta temperatura, en cada tratamiento se agregó lentamente y por las paredes del tubo el agente crioprotector respectivo (GL, EG o DMSO); luego de tener esta dilución final, se dejó reposar por 30 minutos. Después de ese tiempo, se procedió a llenar las pajillas plásticas de 0.25 ml con cada tratamiento.

Para la congelación, se expusieron las pajillas a vapor de nitrógeno líquido, debidamente colocado en una caja de tecnopor, a dos distancias (8 cm y 4 cm) por 10 minutos en cada

una, e inmediatamente después se dejaron sumergir las pajillas en el nitrógeno líquido (Terreros *et al.*, 2015) (anexo, figura 7). Después, las pajillas se acomodaron en las canastillas para luego ser almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido a -196 °C por 7 días.

El proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios en el experimento 4 fué el mismo que en los experimentos anteriores.

3.8. DESCONGELAMIENTO Y EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

Una vez extraídas las pajillas del tanque de nitrógeno líquido, se sumergieron rápidamente en baño maría a 37 °C por 1 minuto (Mondal *et al.*, 2010). El contenido de cada pajilla fué vertido en un eppendorf, los que permanecieron en una estufa a 37 °C evaluándose inmediatamente post descongelamiento según las características seminales.

3.9. EVALUACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS

La evaluación de los espermatozoides epididimarios de los experimentos 1, 2 y 3 se realizó mediante la concentración y la motilidad, mientras que en el experimento 4 además de las características espermáticas antes mencionadas se realizó también la evaluación de la integridad funcional de membrana espermática y la viabilidad e integridad acrosomal.

Las características espermáticas fueron evaluadas de la siguiente manera:

- a. **Motilidad:** la motilidad fué evaluada después de la recuperación de los espermatozoides epididimarios y después del descongelamiento de las pajillas. Para ello, se colocó 20 µl de los espermatozoides epididimarios diluidos en una lámina portaobjeto sobre una platina temperada a 37 °C, luego se cubrió con un cubreobjetos y se evaluó en un microscopio óptico a 40x el porcentaje de

espermatozoides con motilidad progresiva (considerándose solo aquellos que presentaron un movimiento rápido hacia adelante) sobre el total de espermatozoides en cada campo, evaluando un total de 5 campos y realizando el conteo de 100 espermatozoides por campo (Ax *et al.*, 2000).

- b. **Integridad funcional de membrana espermática.** Se realizó mediante la prueba hipoosmótica “HOS” (Jeyendran *et al.*, 1984). La prueba consistió en mezclar 50 μ l de semen en 500 μ l de solución hipoosmótica previamente atemperada a 37 °C por 15 minutos, luego esta mezcla se incubó a 37 °C por 1 hora. Transcurrido este tiempo, se extendió una gota de la mezcla en una lámina portaobjetos y se tiñó con tinción 15 (kit de tinción diferencial rápida (15 segundos), Biopur *diagnostic*) para facilitar la visualización de los espermatozoides reaccionados. Por último, se realizó el conteo de 200 espermatozoides con la ayuda de un microscopio óptico a 40x. Se consideraron como espermatozoides con membrana funcional (HOST+) a los que presentaron hinchazón de la parte distal de la cola espermática o enrollamiento de la misma en respuesta al gradiente osmótico (anexo, figura 8).
- c. **Evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal.** La evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal se realizó mediante la técnica de doble tinción Azul tripan y Giemsa descrita por Didió *et al.* (1989). Para lo cual, se mezclaron 50 μ l de los espermatozoides epididimarios diluidos y 50 μ l de azul tripan al 2 % en un tubo eppendorf, seguidamente se dejó incubar por 10 minutos a 37 °C y luego de este periodo, se realizó 2 a 3 lavados por centrifugación con 1 ml de PBS a 1800 RPM por 6 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 20 μ l de PBS y luego se extendió una gota en una lámina portaobjetos. Posteriormente esta lámina se tiñó con Giemsa al 20% por 40 minutos. La lectura se realizó en un microscopio óptico a 100x. Se clasificaron en 4 categorías: A) Vivos, con acrosoma intacto (región acrosomal rosado y región pos ecuatorial transparente); B) Muerto, con acrosoma intacto (región acrosomal rosado y región pos ecuatorial azul oscuro); C) Vivo, con acrosoma desprendido (región acrosomal transparente y región pos ecuatorial transparente) y D) Muerto, con acrosoma desprendido (región acrosomal transparente con región pos ecuatorial azul oscuro) (anexo, figura 9).

3.10. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Para el análisis estadístico se empleó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 22.0 para Windows. Para todos los experimentos, las variables de motilidad, integridad de la membrana plásmatica y viabilidad e integridad acrosomal fueron transformados para aproximar los valores a la distribución normal. Los valores porcentuales fueron transformados empleando la siguiente ecuación:

$$y = \text{arsen}(\sqrt{(p/100)})$$

Donde:

y: es el valor transformado de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal, o integridad de la membrana plásmatica;

p: es el porcentaje de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal, o integridad de la membrana plásmatica.

El análisis estadístico de los experimentos 1, 2 y 3 se realizó mediante un análisis de regresión lineal múltiple, el cual incluyó como variable dependiente a la motilidad espermática post descongelamiento transformada y como variables independientes a la concentración del crioprotector y el epidídimo del que procedía la muestra. El modelo tuvo la siguiente estructura:

$$y_{ij} = \beta_1 + \beta_2 x_i + \beta_3 x_i^2 + \beta_4 x_i^3 + \beta_5 x_i^4 + \beta_6 x_i^5 + (B * E_j) + e_{ij}$$

Donde:

y_{ij} : es la motilidad post descongelamiento de la muestra ij-ésima;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6$: son los coeficientes de regresión;

x_i : es la concentración i-ésima;

E_j : es el epidídimo j-ésimo;

B: es la matriz de coeficientes de regresión para los epidídimos con una dimensión de $j \times j$.

A partir de este modelo, se hallaron los coeficientes de regresión. Una vez conocidos estos coeficientes, el modelo de regresión fue derivado en función de la variable x e igualada la función a cero para conocer a que concentraciones de los crioprotectores las pendientes de las tangentes de la curva eran iguales a cero:

$$dy/dx = \beta_2 + 2\beta_3 x + 3\beta_4 x^2 + 4\beta_5 x^3 + 5\beta_6 x^4 = 0$$

Donde:

dy/dx : es la derivada de la función y, tangente de la curva;

$\beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6$: son los coeficientes de regresión;

x: es la concentración donde la tangente de la curva es igual a cero.

Para hallar las concentraciones en donde la tangente de la curva es igual a cero se empleó el método de Ferrari para la solución de las ecuaciones de cuarto grado (Oostra, 2008). Luego de hallar dichas concentraciones, éstas fueron reemplazadas en el modelo de regresión para verificar a que concentración se obtenía la motilidad mas alta, dicha concentración fue determinada como la concentración óptima encontrada para cada crioprotector.

En el experimento 4, para evaluar el efecto del crioprotector sobre la motilidad, integridad de membrana plasmática y viabilidad e integridad acrosomal post descongelamiento, se utilizó un análisis de varianza. En este análisis se incluyeron como factores fijos los crioprotectores a la concentración óptima previamente determinada y como factores al azar los epidídimos del que provenían las muestras. Se realizó una comparación multiple para determinar entre que tratamientos hubo diferencia estadística significativa dentro de cada prueba para lo cual se utilizó la Prueba de Tukey. Para todos los análisis un nivel de significancia de 5% fue considerado significativo.

IV.RESULTADOS

4.1. Experimento 1: Determinación de la concentración óptima del glicerol para criopreservar espermatozoides epididimarios

En el cuadro 5 podemos observar los resultados de motilidad espermática por descongelamiento con las diferentes concentraciones de glicerol evaluadas en el estudio. Como apreciamos, la motilidad espermática post descongelamiento alcanzó los valores más elevados a las concentraciones de 1 M y 1.25 M de glicerol, asimismo, observamos que las motilidades espermáticas obtenidas cuando se emplean concentraciones de 0 M, 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M y 1 M tienden a aumentar conforme se aumenta la concentración de glicerol, por el contrario, cuando se emplean concentraciones de 1.25 M, 1.50 M, 1.75 M, se puede observar que la motilidad tiende a disminuir conforme se aumenta la concentración de glicerol.

Para determinar la concentración óptima del glicerol se empleó un modelo de regresión polinomial quíntuple. Los resultados del análisis de regresión los podemos observar en el cuadro 6 y 7. Como se puede observar, el modelo de regresión presenta un coeficiente de determinación ajustado de 78.8% (cuadro 6), lo cual nos indica que el modelo de regresión empleado explica bien la varianza de la motilidad espermática post-descongelamiento. Asimismo, como podemos observar en el cuadro 7, el análisis de regresión fue altamente significativo ($p < 0.001$).

En la figura 10, observamos la curva estimada de los resultados de motilidad espermática post-descongelamiento para las diferentes concentraciones de glicerol, mientras que en la figura 11, observamos la curva de la derivada del modelo de regresión. En la figura 10 podemos observar que en la curva de las motilidades espermáticas estimadas según el modelo de regresión, el pico de la motilidad espermática ocurre entre los valores de 1 M a 1,25 M. En la figura 11 observamos que la curva de la derivada del modelo de regresión se intercepta 4 veces con el eje x de la gráfica, por lo que podemos indicar que esta ecuación presenta 4 puntos la tangente de la curva derivada es igual a cero. En el cuadro 8, podemos observar las 4 soluciones de la derivada del modelo de regresión. Como podemos apreciar a la concentración de 1.16 M es la concentración óptima de glicerol porque permitió alcanzar una mayor motilidad espermática post descongelamiento (35.67%).

Cuadro 5: Motilidad inicial y motilidad post descongelamiento con diferentes concentraciones de glicerol en espermatozoides epididimarios de alpaca

	Glicerol
Motilidad inicial	66 ± 7.84
Motilidad Post descongelamiento	
T1 (0.00 M)	10.00 ± 00.00
T2 (0.25 M)	22.00 ± 11.43
T3 (0.50 M)	23.00 ± 12.24
T4 (0.75 M)	26.00 ± 13.29
T5 (1.00 M)	34.00 ± 13.29
T6 (1.25 M)	36.00 ± 13.29
T7 (1.50 M)	26.00 ± 12.16
T8 (1.75 M)	22.00 ± 11.43

Valores son promedios \pm límite de confianza al 95%

Cuadro 6: Análisis de regresión de las concentraciones de glicerol

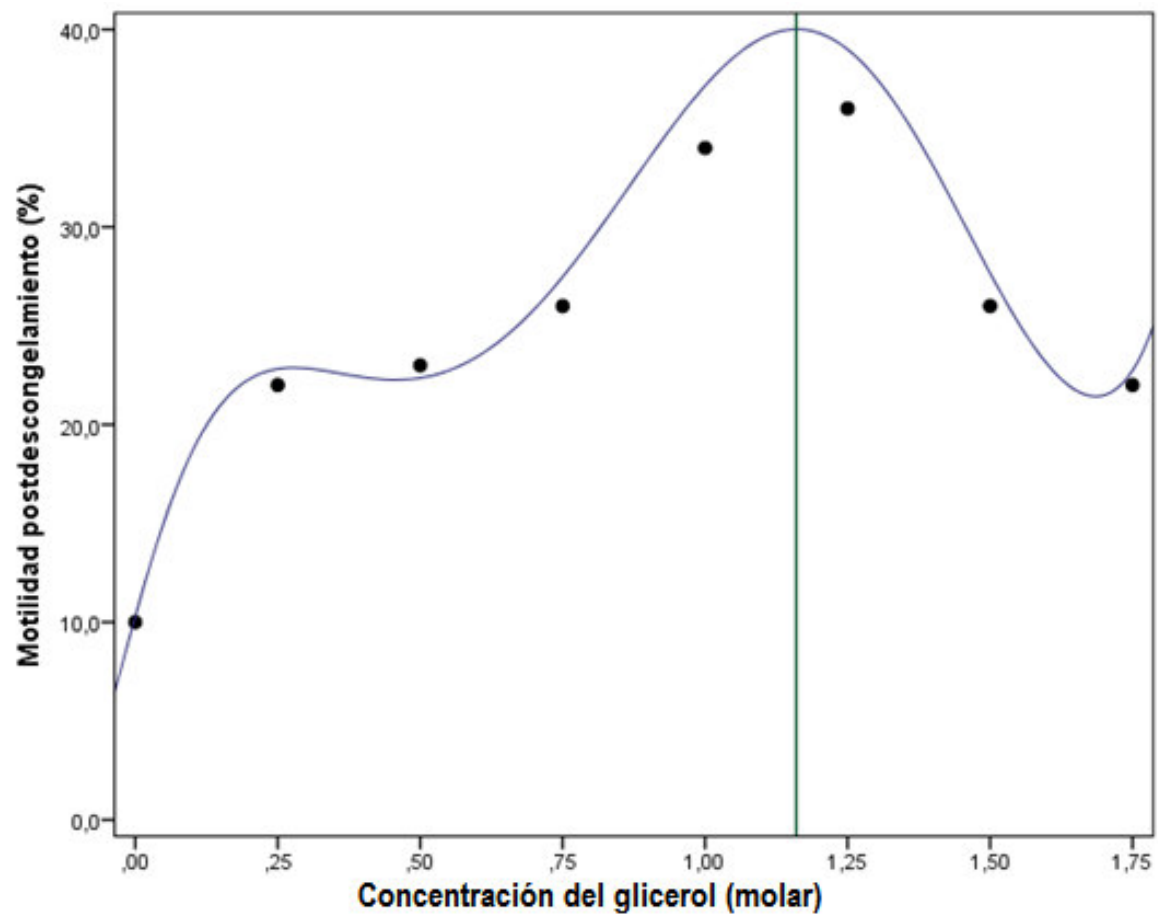
R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
0.915	0.837	0.788	0.078

Cuadro 7: Análisis de variancia de las concentraciones de glicerol

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	.925	9	.103	17.101	0.000
Residuo	.180	30	.006		
Total	1.105	39			

Cuadro 8: Soluciones de la derivada del modelo de regresión polinomial quántuple, motilidades estimadas para cada solución e intervalo de confianza al 95% de las motilidades estimadas.

Solución	Concentración (M)	Motilidad estimada (%)	Intervalo de confianza de la estimación al 95%
X1	1.69	19.70	15.39 – 24.40
X2	1.16	35.67	27.25 – 44.56
X3	0.46	20.80	14.47 – 27.93
X4	0.28	21.34	16.39 – 26.75



$$y_{ij} = 0.291 + 1.624 x_i - 5.886 x_i^2 + 9.111 x_i^3 - 5.863 x_i^4 + 1.310 x_i^5 + (B * E_j) + e_{ij}$$

Figura 10. Diagrama de regresión polinomial quáuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de glicerol

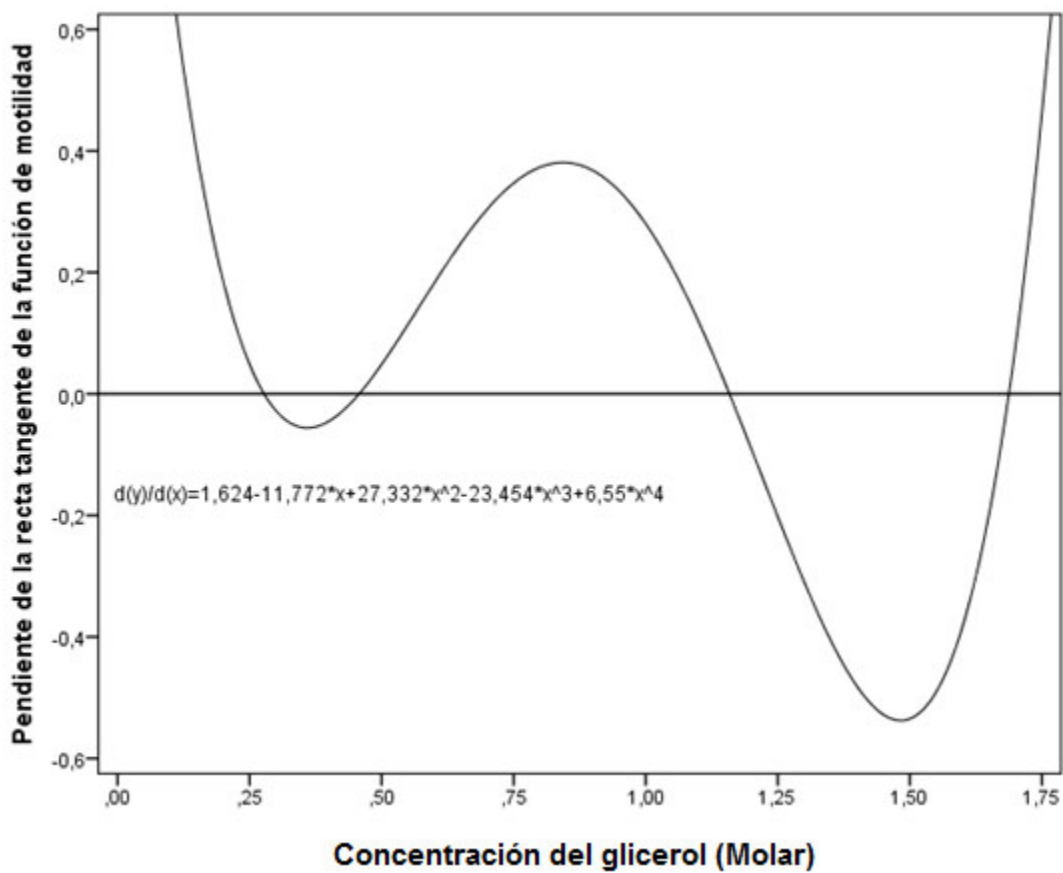


Figura 11. Diagrama de la derivada de la regresión polinomial quintuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de glicerol

4.2. Experimento 2: Determinación de la concentración óptima del etilenglicol para criopreservar espermatozoides epididimarios

En el cuadro 9 podemos observar los resultados de motilidad espermática por descongelamiento con las diferentes concentraciones de etilenglicol evaluadas en el estudio. Al igual que en el experimento anterior, la motilidad espermática por descongelamiento alcanzó los valores más elevados alrededor de la concentración de 1 M de etilenglicol, asimismo, observamos que las motilidades espermáticas obtenidas cuando se emplean concentraciones de 0 M, 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M y 1 M tienden a aumentar conforme se aumenta la concentración de etilenglicol, por el contrario, cuando se emplean

concentraciones de 1.25 M, 1.50 M, 1.75 M, se puede observar que la motilidad tiende a disminuir conforme se aumenta la concentración de etilenglicol.

Para determinar la concentración óptima del etilenglicol se empleó un modelo de regresión polinomial quintuple. Los resultados del análisis de regresión los podemos observar en el cuadro 10 y 11. Como podemos observar, el modelo de regresión presenta un coeficiente de determinación ajustado de 65.3% (cuadro 10), lo cual nos indica que el modelo de regresión empleado explica bien la varianza de la motilidad espermática post-descongelamiento. Asimismo, como podemos observar en el cuadro 11, el análisis de regresión fue altamente significativa ($p < 0.001$).

En la figura 14, observamos la curva estimada de los resultados de motilidad espermática post-descongelamiento para las diferentes concentraciones de etilenglicol, mientras que en la figura 15, observamos la curva de la derivada del modelo de regresión. En la figura 14 podemos observar que en la curva de las motilidades espermáticas estimadas según el modelo de regresión, el pico de la motilidad espermática ocurre alrededor del valor de 1 M. En la figura 15 observamos que la curva de la derivada del modelo de regresión se intercepta 2 veces con el eje x de la gráfica, por lo que podemos indicar que esta ecuación presenta 2 puntos la tangente de la curva derivada es igual a cero, dentro del rango de concentraciones estudiado. En el cuadro 16, podemos observar las 2 soluciones de la derivada del modelo de regresión. Como podemos apreciar a la concentración de 0.9 M es la concentración óptima de glicerol porque permitió alcanzar una mayor motilidad espermática post descongelamiento (11.49%).

Cuadro 9: Motilidad inicial y motilidad post descongelamiento con diferentes concentraciones de etilenglicol en espermatozoides epididimarios de alpaca

	Etilenglicol
Motilidad inicial	64.00 \pm 7.84
Motilidad Post descongelamiento	
T1 (0.00 M)	5.40 \pm 3.20
T2 (0.25 M)	8.40 \pm 5.73
T3 (0.50 M)	9.00 \pm 3.67
T4 (0.75 M)	11.00 \pm 4.80
T5 (1.00 M)	12.00 \pm 3.92
T6 (1.25 M)	11.00 \pm 3.67
T7 (1.50 M)	9.40 \pm 3.31
T8 (1.75 M)	8.00 \pm 2.40

Valores son promedios \pm límite de confianza al 95%

Cuadro 10: Análisis de regresión de las concentraciones de etilenglicol

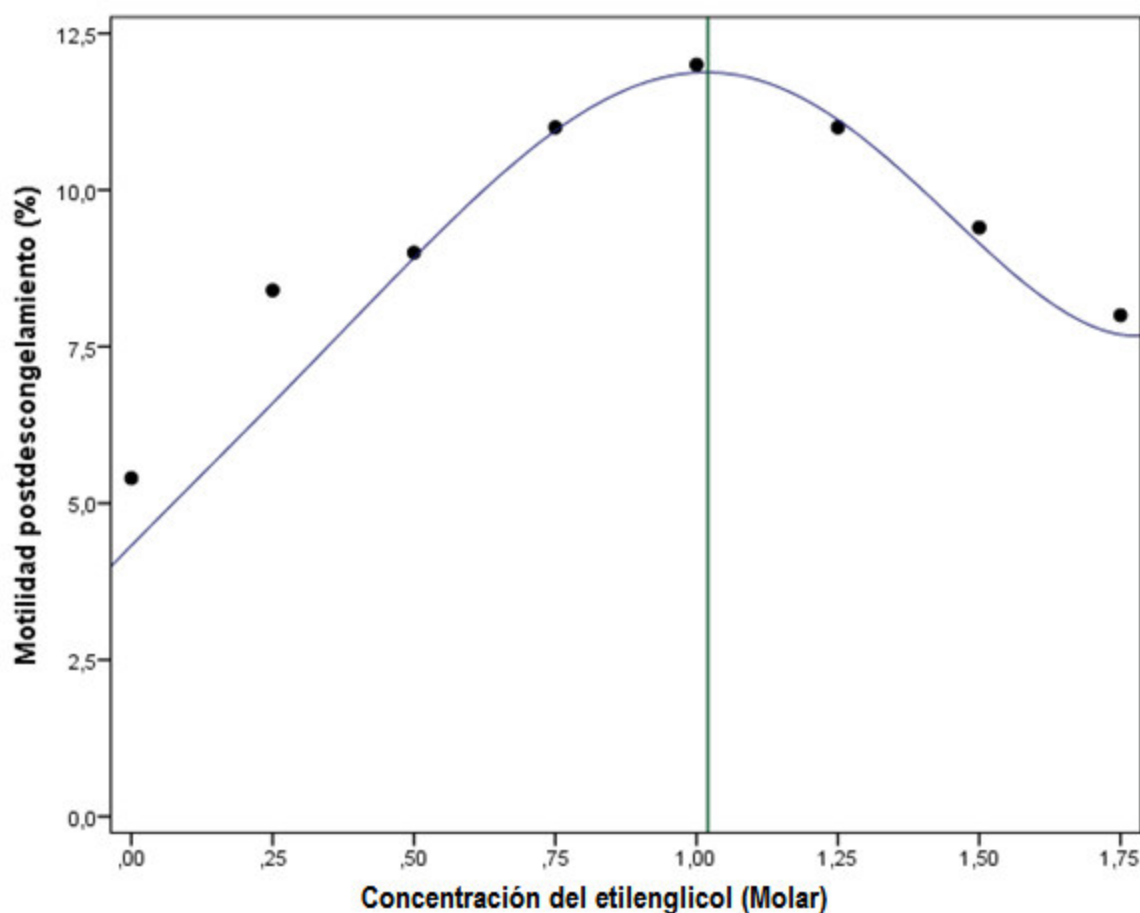
R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
0.860	0.740	0.662	0.056

Cuadro 11: Análisis de variancia de las concentraciones de etilenglicol

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	.268	9	.030	9.487	0.000
Residuo	.094	30	.003		
Total	0.363	39			

Cuadro 12: Soluciones de la derivada del modelo de regresión polinomial quintuple, motilidades estimadas para cada solución e intervalo de confianza al 95% de las motilidades estimadas.

Solución	Concentración (M)	Motilidad estimada (%)	Intervalo de confianza de la estimación al 95%
X1	1.76	7.82	7.46 – 8.18
X2	1.02	11.49	9.04 – 14.19



$$y_{ij} = 0.211 + 0.221 x_i - 0.148 x_i^2 + 0.252 x_i^3 - 0.266 x_i^4 + 0.078 x_i^5 + (B * E_j) + e_{ij}$$

Figura 12. Diagrama de regresión polinomial quintuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de etilenglicol

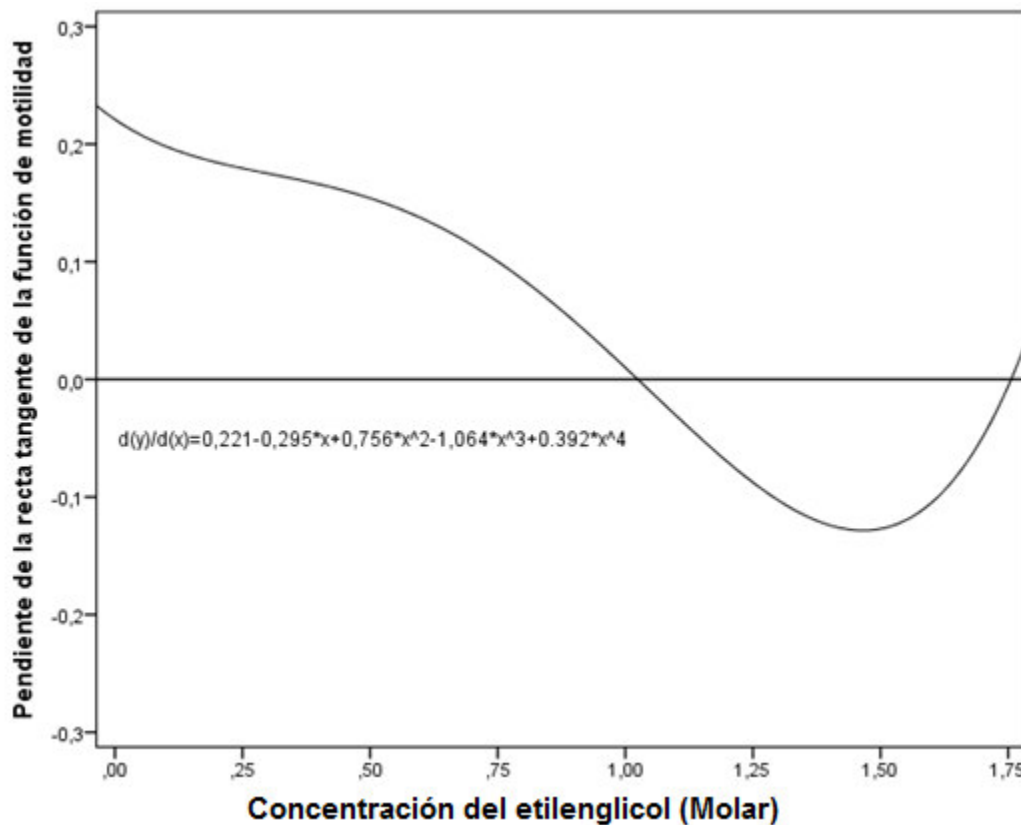


Figura 13. Diagrama de la derivada de la regresión polinomial quintuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de etilenglicol

4.3. Experimento 3: Determinación de la concentración óptima del dimetil sulfóxido (DMSO) para criopreservar espermatozoides epididimarios

En el cuadro 13 podemos observar los resultados de motilidad espermática por descongelamiento con las diferentes concentraciones de DMSO evaluadas en el estudio. Del mismo modo que en los experimentos anteriores, la motilidad espermática por descongelamiento alcanzó los valores más elevados alrededor de la concentración de 1 M de DMSO, asimismo, observamos que las motilidades espermáticas obtenidas cuando se emplean concentraciones de 0 M, 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M y 1 M tienden a aumentar

conforme se aumenta la concentración de DMSO, por el contrario, cuando se emplean concentraciones de 1.25 M, 1.50 M, 1.75 M, se puede observar que la motilidad tiende a disminuir conforme se aumenta la concentración de DMSO.

Para determinar la concentración óptima del DMSO se empleó un modelo de regresión polinomial quíntuple. Los resultados del análisis de regresión los podemos observar en el cuadro 14 y 15. Como podemos observar, el modelo de regresión presenta un coeficiente de determinación ajustado de 66.2% (cuadro 14), lo cual nos indica que el modelo de regresión empleado explica bien la varianza de la motilidad espermática post-descongelamiento. Asimismo, como podemos observar en el cuadro 15, el análisis de regresión fue altamente significativa ($p < 0.001$).

En la figura 14, observamos la curva estimada de los resultados de motilidad espermática post-descongelamiento para las diferentes concentraciones de etilenglicol, mientras que en la figura 15, observamos la curva de la derivada del modelo de regresión. En la figura 14 podemos observar que en la curva de las motilidades espermáticas estimadas según el modelo de regresión, el pico de la motilidad espermática ocurre alrededor del valor de 1 M. En la figura 15 observamos que la curva de la derivada del modelo de regresión se intercepta 2 veces con el eje x de la gráfica, por lo que podemos indicar que esta ecuación presenta 2 puntos la tangente de la curva derivada es igual a cero, dentro del rango de concentraciones estudiado. En el cuadro 16, podemos observar las 2 soluciones de la derivada del modelo de regresión. Como podemos apreciar a la concentración de 0.90 M es la concentración óptima de glicerol porque permitió alcanzar una mayor motilidad espermática post descongelamiento (21.51%).

Cuadro 13: Motilidad inicial y motilidad post descongelamiento con diferentes concentraciones de DMSO en espermatozoides epididimarios de alpaca

	DMSO
Motilidad inicial	70.00 ± 7.16
Motilidad Post descongelamiento	
T1 (0.00 M)	8.00 ± 5.00
T2 (0.25 M)	12.33 ± 4.16
T3 (0.50 M)	14.50 ± 4.20
T4 (0.75 M)	22.50 ± 7.90
T5 (1.00 M)	24.17 ± 7.34
T6 (1.25 M)	15.00 ± 5.66
T7 (1.50 M)	14.00 ± 3.67
T8 (1.75 M)	12.83 ± 5.29

Valores son promedios ± límite de confianza al 95%

Cuadro 14: Análisis de regresión de las concentraciones de DMSO

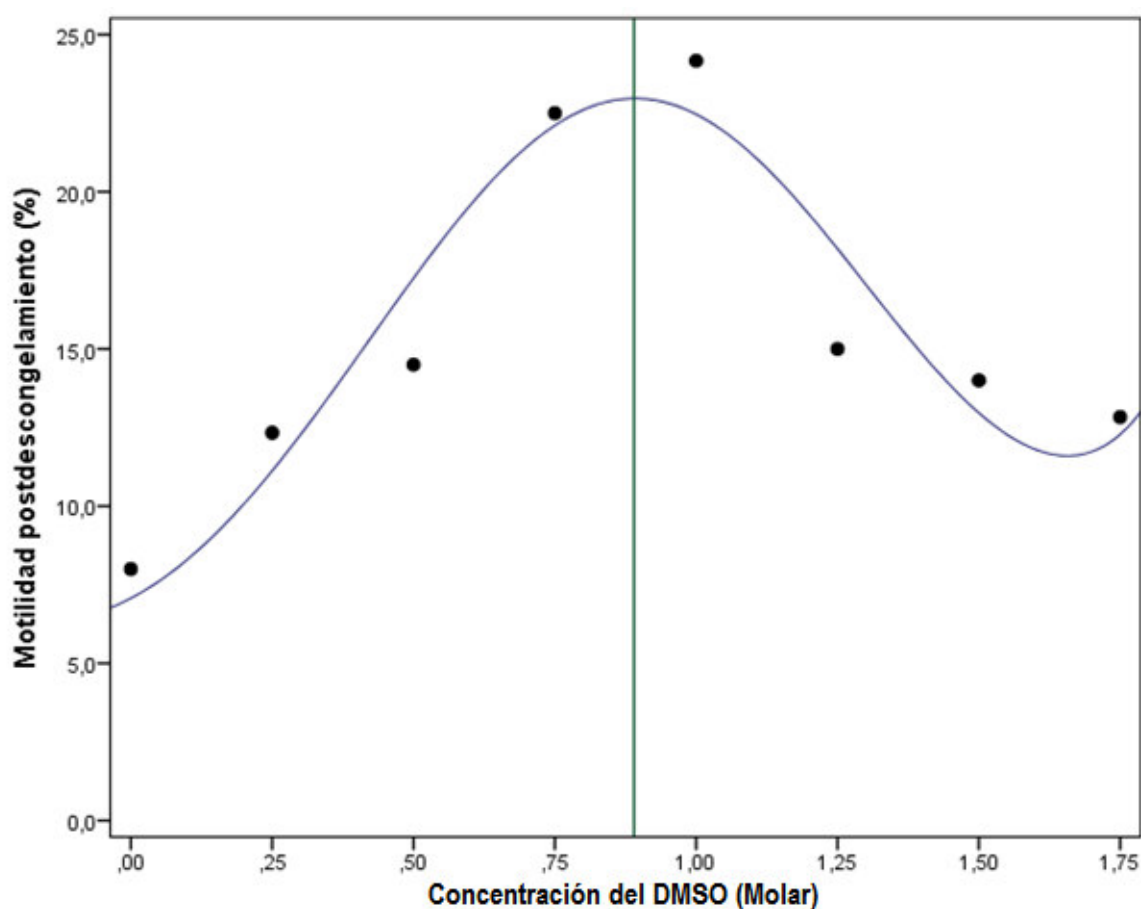
R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
0.854	0.730	0.653	0.072

Cuadro 15: Análisis de variancia de las concentraciones de DMSO

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	.489	10	.049	9.466	0.000
Residuo	.181	35	.005		
Total	0.670	45			

Cuadro 16: Soluciones de la derivada del modelo de regresión polinomial quíntuple, motilidades estimadas para cada solución e intervalo de confianza al 95% de las motilidades estimadas.

Solución	Concentración (M)	Motilidad estimada (%)	Intervalo de confianza de la estimación al 95%
X1	1.65	11.68	9.08 – 14.57
X2	0.90	21.51	18.70 – 24.47



$$y_{ij} = 0.134 + 0.178 x_i + 0.508 x_i^2 - 0.536 x_i^3 - 0.015 x_i^4 + 0.075 x_i^5 + (B * E_j) + e_{ij}$$

Figura 14. Diagrama de regresión polinomial quíntuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de DMSO

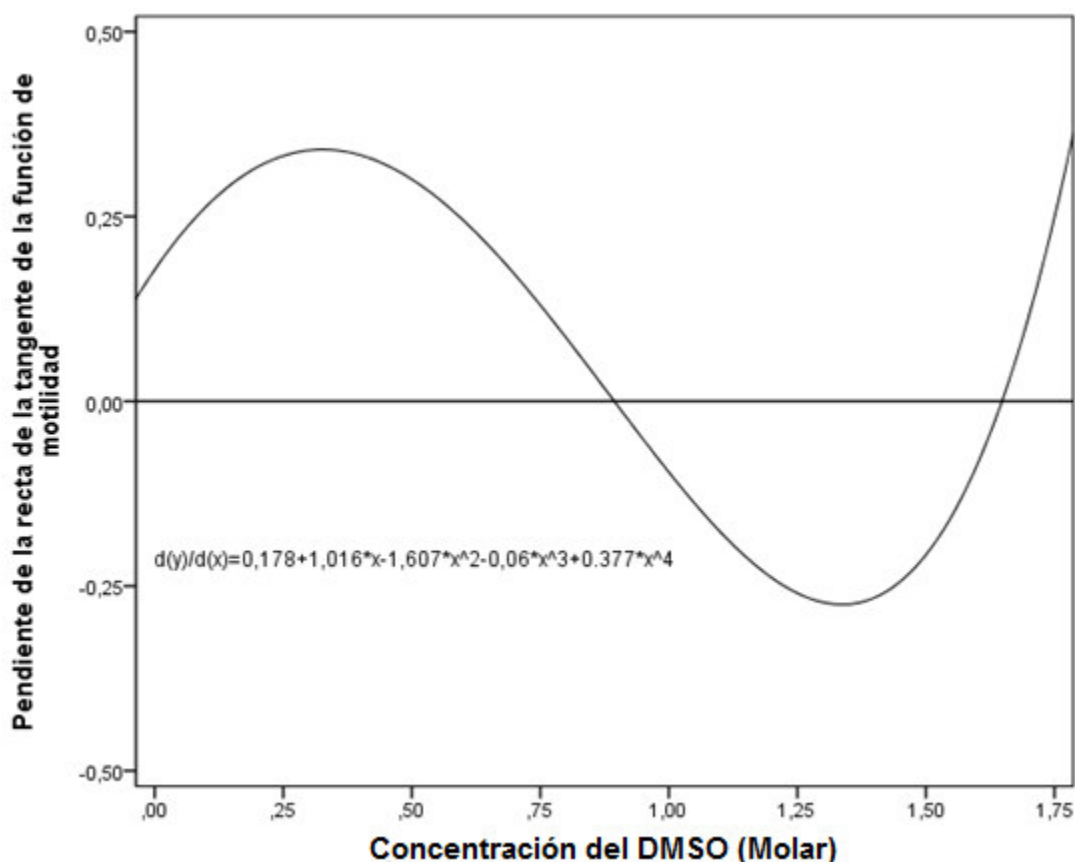


Figura 15. Diagrama de la derivada de la regresión polinomial quintuple de los resultados de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento con diferentes concentraciones de DMSO

4.4. Experimento 4: Comparación de la concentración óptima del glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido para criopreservar espermatozoides epididimarios

Los espermatozoides epididimarios presentaron promedios iniciales de motilidad de 67.5%, integridad funcional de membrana plasmática de 81.75% y viabilidad e integridad acrosomal de 75.83% (cuadro 17).

En el cuadro 17, se observa que los mayores promedios de las tres características evaluadas post descongelamiento lo obtuvo el T4, sin embargo, al compararlo con los promedios del T2 no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). Por otro lado, al

comparar T4 y T2 con los promedios alcanzados por T3 si se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$); asimismo hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos T2, T3 y T4 en comparación con el tratamiento T1 sin crioprotector.

Cuadro 17: Efecto de la concentración óptima del glicerol, etilenglicol y DMSO sobre las características espermáticas al inicio y después de la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS EVALUADAS			
	Motilidad espermática (%)	Integridad funcional de membrana (%)	Viabilidad e integridad acrosomal (%)
Inicial	67.5 ± 2.18	81.75 ± 2.70	75.83 ± 2.56
Post descongelamiento			
T1 (Sin crioprotector)	7.25 ± 3.04 ^c	15.33 ± 4.20 ^c	9.92 ± 2.84 ^c
T2 (1.16 M GI)	30.83 ± 5.51 ^a	45.00 ± 7.36 ^a	33.75 ± 5.63 ^a
T3 (1.02 M EG)	17.42 ± 6.89 ^b	32.17 ± 7.96 ^b	21.00 ± 4.22 ^b
T4 (0.9 M DMSO)	35.83 ± 5.24 ^a	51.75 ± 6.71 ^a	38.25 ± 3.85 ^a

Valores son promedios ± límite de confianza al 95%

^{a, b, c} Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas

V. DISCUSIÓN

Actualmente no se cuenta con protocolos de criopreservación de semen de alpacas que brinden resultados óptimos de calidad espermática post descongelamiento y que aseguren su eficiencia en inseminación artificial, esto se debe principalmente a las características inherentes del semen (especialmente la alta viscosidad) (Bravo *et al.*, 1997b; Morton *et al.*, 2008; Giuliano *et al.*, 2010) lo que ha conllevado a problemas en cuanto a la manipulación y procesamiento de las muestras seminales (Tibary y Memon, 1999). Para eliminar el factor viscosidad del semen, el presente estudio utilizó espermatozoides epididimarios, los cuales no están mezclados con el plasma seminal viscoso y además se encuentran en un nivel de maduración final (Canorio, 2008), son viables y poseen capacidad fecundante (Reyes-Moreno *et al.*, 2002, Barrios, 2002). Además al parecer no existirían diferencias al trabajar con espermatozoides obtenidos del epidídimo y espermatozoides eyaculados (Rodríguez, 2009) lo que podría justificar el uso de estos espermatozoides como una alternativa para investigar las bases del proceso de congelación y descongelación en alpacas (Morton *et al.*, 2008).

En cuanto a la utilización de los espermatozoides epididimarios es importante conocer el tiempo de supervivencia de estos desde el momento en que se beneficia o castra al animal hasta que son procesados en el laboratorio. Al respecto, Banda *et al.* (2010) señalaron que el momento de recuperación de los espermatozoides epididimarios afecta significativamente la motilidad espermática, siendo menos de 35 horas el tiempo idóneo para obtener una motilidad aceptable. Otros estudios mencionan que es posible recuperar y congelar espermatozoides de alpaca a las 8 horas (Morton *et al.*, 2007), 14 horas (Rodríguez, 2009) y 20 a 30 horas del beneficio (Gonzales, 2008).

En el presente estudio, la recuperación de los espermatozoides epididimarios se realizó a las 22 horas luego del beneficio de los animales, lo que concuerda con el tiempo aceptado para la utilización de los espermatozoides señalado por Banda *et al.* (2010). Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos con los reportados por Morton *et al.* (2007) de 8 horas, observamos que el tiempo de recuperación de los espermatozoides si influye en el porcentaje de motilidad post descongelamiento; ya que estos autores a partir de una motilidad inicial de 46.9% y utilizando un dilutor a base de lactosa y glicerol lograron obtener una motilidad post descongelamiento de 31.9 % mayor al obtenido en este estudio de 30.83 % con el glicerol, 17.42 % con el etilenglicol y 35.83 % con el DMSO a partir de una motilidad inicial de 67.5 % y utilizando como dilutor base la leche descremada. Por ello consideramos que el transporte y mantenimiento de la muestra a una temperatura de 5 °C es fundamental, porque favorece la conservación de los espermatozoides epididimarios debido a que a estas temperaturas existe una disminución del metabolismo celular (Salomon y Maxwell, 2000) impidiendo de esta manera los fenómenos autolíticos que podrían ocasionar daño de las membranas y organelas y en consecuencia la disminución de la viabilidad espermática.

Otros factores que influyen en el proceso de criopreservación de los espermatozoides son el tipo de dilutor, el agente crioprotector (tipo y concentración) (Fahy *et al.*, 1990), el tiempo de exposición del espermatozoide al crioprotector, la temperatura del crioprotector durante la exposición, la tasa de congelamiento/descongelamiento, entre otros (Watson, 1990), pero

el principal factor involucrado son las características de semen de cada especie (Watson, 1979, Medeiros *et al.*, 2002).

Por su parte, los dilutores comúnmente utilizados en la criopreservación de semen y espermatozoides epididimarios de alpacas son a base de TRIS (tris - hidroximetilaminometano), citrato, lactosa o leche descremada con glucosa o fructuosa y yema de huevo (Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2007, 2010; Banda *et al.*, 2010; Choez *et al.*, 2013; Terreros *et al.*, 2015). En este estudio se utilizó un dilutor en base a leche descremada, fructosa y yema de huevo, ya que existen diversos trabajos donde se ha demostrado la eficiencia de este dilutor en la mejora de la motilidad, integridad acrosomal y viabilidad de los espermatozoides epididimarios después del proceso de criopreservación (Banda *et al.*, 2010; Terreros *et al.*, 2015). Esto podría deberse a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la yema de huevo que actúan como crioprotector no penetrante al recubrir la membrana plasmática del espermatozoide protegiéndolo del choque térmico (Watson, 1981; Maxwell y Evans, 1990; Moussa *et al.*, 2002). Se postula que durante la congelación- descongelación, las LDL son desbaratadas y los fosfolípidos son liberados en el medio, y vendrían a formar una cubierta protectora en la superficie de las células espermáticas (Hu *et al.*, 2010). Adicionalmente, las proteínas de la leche actúan como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salomon y Maxwell, 1995; Salomon y Maxwell, 2000).

Los resultados post descongelamiento obtenidos utilizando este dilutor con el etilenglicol en la motilidad (17.42 %), integridad funcional de membrana plasmática (32.17 %) y viabilidad e integridad acrosomal (21 %) son similares a los de Banda *et al.* (2010) quienes obtuvieron porcentajes de 17, 17.9 y 27.2 % respectivamente para las características espermáticas antes mencionadas. Sin embargo cuando se utilizó con el glicerol (30.83, 45 y 33.75 %) se obtuvo mejores resultados que Choez *et al.* (2013) quién reportó porcentajes de 25, 33 y 20 % para estas características. Asimismo, al comparar el porcentaje de motilidad del glicerol (23.89%), etilenglicol (8.3 %) y DMSO (31.11) obtenido por Terreros *et al.* (2015) se encontró que son similares el presente estudio.

Por otro lado, el tipo y concentración del crioprotector también influencia el proceso de criopreservación de los espermatozoides (Watson, 1990). En alpacas, el crioprotector más utilizado es el glicerol y ha sido empleado en concentraciones de 7 % (0.96 M) (Santiani *et al.*, 2005; Terreros *et al.*, 2015), 6% (0.82 M) (Banda *et al.*, 2010) y 2 - 4% (0.27- 0.55 M) (Morton *et al.*, 2007, 2010) obteniendo valores de post descongelamiento de 6 hasta 24%. Debido a los efectos tóxicos del glicerol (Amann y Pickett, 1987, Hammerstedt *et al.*, 1990, Hammerstedt y Graham, 1992, Garner *et al.*, 1999) se han experimentado con otros crioprotectores como el etilenglicol y el dimetil sulfóxido (DMSO). En lo que respecta al etilenglicol, éste se ha empleado en 1% (0.2 M) (Banda *et al.*, 2010) y 0.7% (0.125 M) (Santiani *et al.*, 2005), 7% (1.25 M) (Terreros *et al.*, 2015) logrando luego de la descongelación porcentajes de motilidad que varían entre 1 a 20 %; cabe mencionar que Terreros *et al.* (2015) obtuvieron menores resultados que Santiani *et al.* (2005) posiblemente por la concentración del crioprotector utilizada. Otro crioprotector empleado ha sido el DMSO en concentraciones de 0.9 % (0.125 M), 1.8% (0.25 M) (Canorio, 2008) y 7 % (0.98 M) (Terreros *et al.*, 2015) alcanzando motilidades post descongelamiento de hasta 33 %.

En todos los estudios antes mencionados, a pesar de los grandes esfuerzos aún no se ha reportado el tipo y concentración ideal del crioprotector o crioprotectores, que permita obtener mayores porcentajes de motilidad luego del proceso de criopreservación, lo que es de suma importancia puesto que los crioprotectores son altamente especie específicos y su efectividad varía en función de la concentración utilizada (Gao *et al.*, 1995). Al respecto, el presente estudio determinó la concentración óptima de los crioprotectores: glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido, las cuales fueron de 1.16 M, 1.02 y 0.9 M respectivamente. A estas concentraciones se lograron obtener mayores resultados de motilidad post descongelamiento para el glicerol (30.83 %) y DMSO (35.83 %), pero menores en cuanto al etilenglicol (17.42 %). En otras especies, la concentración empleada del glicerol se encuentra en un rango de 0.548 - 1.096 M para bovinos, caninos, primates y algunos rumiantes salvajes (Mayenco y Gómez-Cuétara, 1996; Peña *et al.*, 1998; Holt, 2000). Por otro lado, la concentración del etilenglicol en ovinos es de 0.269 a 1.078 M (Molinia *et al.*, 1994) y en equinos es de 0.539 M (Mantovani *et al.*, 2002). Con respecto al DMSO, las

concentraciones reportadas son en primates de 0.84 M (Feradis *et al.*, 2001), en peces de 1.4 M (Lahnsteiner *et al.*, 2000) y en conejos de 1.68 M (Bamba y Adams, 1990).

Otro objetivo de este estudio fué determinar cual de estos tres crioprotectores en su concentración óptima conservaba mejor las características de motilidad, integridad funcional de la membrana plasmática y viabilidad e integridad de la membrana acrosomal, por ello se desarrolló un cuarto experimento. En el cuarto experimento, los resultados determinaron que el glicerol y DMSO presentan mayores porcentajes de motilidad espermática, integridad funcional de membrana plasmática y viabilidad e integridad acrosomal respecto al etilenglicol. Posiblemente, esto podría deberse al tiempo de exposición de los crioprotectores con los espermatozoides, el cual aparentemente no fué favorable para el etilenglicol, que por su fácil penetración celular (Massip, 2001) y congelación rápida, al dejarlo mucho tiempo expuesto va a ejercer más efectos tóxicos sobre la célula que los ejercidos por el glicerol y el DMSO; produciendo alteraciones celulares que afectarían a las características evaluadas. Por su parte, el glicerol a pesar de los efectos nocivos que ejerce sobre la célula; aparentemente, al penetrar más lentamente no alcanza a ejercer tanto daño como el etilenglicol. Asimismo, se ha demostrado que los espermatozoides de diversas especies varían en respuesta al tipo y exposición de los crioprotectores (Gao *et al.*, 1995; Medeiros *et al.*, 2002). Por lo tanto, es necesario conocer los límites de tolerancia osmótica, la respuesta a la adición, penetración y remoción de los crioprotectores y la tasa de congelamiento a la que son expuestos los espermatozoides para mejorar el desarrollo de la criopreservación espermática (Ball y Vo, 2001; Wessel y Ball, 2004).

La motilidad es una de las características espermáticas más importantes durante la evaluación seminal, la mayoría de los investigadores la utilizan como el determinante al evaluar técnicas de congelación, diluyentes y crioprotectores. Este parámetro es difícil de evaluarlo en semen eyaculado de alpaca debido a la motilidad oscilatoria que presenta (Bravo *et al.*, 2002) sin embargo puede ser evaluado en espermatozoides epididimarios, ya que estos presentan motilidad progresiva (Giuliano *et al.*, 2012). En alpacas, existe una gran variabilidad en los valores de motilidad obtenidos post descongelamiento tanto en el

semen como en los espermatozoides epididimarios, reportándose motilidades post descongelamiento que varían entre 0 a 25 % a partir de motilidades iniciales de 30 a 98 %. (Valdivia *et al.*, 1999; Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2010; Banda *et al.*, 2010; Terreros *et al.*, 2015), lo que podría deberse a la motilidad inicial de las muestras antes del congelamiento (Choez *et al.*, 2013). Al respecto, Choez *et al.*, 2013 demostraron que los espermatozoides epididimarios que tienen una motilidad inicial mayor a 60 %, logran mejores porcentajes de motilidad después del descongelamiento en comparación con los espermatozoides que inician con motilidades menores a 60 %; lo que también fue reportado por Morton *et al.*, 2010 y Terreros *et al.*, 2015.

Por lo expuesto anteriormente, en este estudio partimos de motilidades mayores o iguales al 60 %, obteniendo un porcentaje de motilidad post descongelamiento para el glicerol de 31 %, el cual es mayor si se compara con los resultados de otros estudios, donde se obtuvieron porcentajes menores de 15 % Santiani *et al.* (2005), 16, 20, 18 y 7 % Morton *et al.* (2007, 2010) y 24 % Terreros *et al.* (2015) a pesar de haberse utilizado un dilutor en base a leche descremada o lactosa. En tanto que, este resultado es similar al logrado por Ordoñez y Verastegui. (2007) quienes obtuvieron un porcentaje de 32 %, pero a diferencia del presente estudio utilizaron el dilutor Tris con glicerol al 8 % (1.09 M). Por otro lado, con el DMSO, se logró el mejor porcentaje de 36% similares a los reportes de Canorio (2008) y Terreros *et al.* (2015) de 33 y 32% respectivamente, sin embargo, cabe recalcar que tanto el dilutor a base de citrato como la concentración (1.8% (0.25 M)) utilizada por Canorio (2008) fueron diferentes a las utilizadas por el presente estudio y por Terreros *et al.* (2015). Lo que demostraría que se pueden utilizar concentraciones mas bajas de DMSO si se utiliza como dilutor al citrato. Con respecto al etilenglicol, nuestro estudio obtuvo un porcentaje de 17% igual al obtenido por Banda *et al.* (2010), pero mayores a los alcanzados por Terreros *et al.* (2015) y Ordoñez y Verastegui. (2007) quienes obtuvieron porcentajes de 8 % (1.25 M) y 4 % (1.79 M) respectivamente al utilizar concentraciones más altas de etilenglicol, lo que al parecer resultaron ser más tóxicas para el espermatozoide de alpaca.

Para la integridad funcional de membrana plasmática, los porcentajes obtenidos por el presente estudio para el glicerol, etilenglicol y DMSO fueron de 45, 32 y 52 % respectivamente, los que son superiores a los reportados por Banda *et al.* (2010) cuyos porcentajes utilizando glicerol y etilenglicol fueron de 24 y 17 %; asimismo Terreros *et al.* (2015) reportaron porcentajes de 26, 18 y 29 % utilizando los mismos crioprotectores, lo cual podría ocurrir debido a la técnica de congelación empleada de dos pasos, en donde existe un mayor tiempo de exposición de los crioprotectores y por consiguiente se ejercería un mayor efecto sobre la membrana de los espermatozoides.

La viabilidad espermática es reducida a un 50% durante la criopreservación, porque durante este proceso, el espermatozoide está sujeto a estrés químico, osmótico, térmico y mecánico debido a la adición y remoción de los crioprotectores, el descenso de temperatura, la reorganización a nivel de membrana y la producción de especies reactivas de oxígeno (Woods *et al.*, 2004; Stornelli *et al.*, 2005). Lo cual conlleva a que los espermatozoides post descongelamiento presenten daño a la membrana plasmática, al acrosoma y a la cola del espermatozoide, y por tanto, capaz de afectar a la habilidad fecundante del espermatozoide (Watson 2000). Por ello, los espermatozoides totalmente funcionales que presentan membranas intactas, actividad mitocondrial y flagelo con actividad normal son poco numerosos luego del proceso de criopreservación (De Leeuw *et al.*, 1990; Parks y Graham, 1992; Drobnis *et al.*, 1993; Watson, 1995; Holt, 2000).

Con respecto al promedio de los porcentajes de viabilidad e integridad acrosomal post descongelamiento para el glicerol, etilenglicol y DMSO fueron de 34, 21 y 38 % respectivamente, lo cual es aceptable en comparación con el estudio de Santiani *et al.* (2005) en donde los promedios fueron inferiores de 13 y 19 % para el glicerol y etilenglicol. En tanto, Banda *et al.* (2010) cuando usaron glicerol y etilenglicol obtuvieron resultados similares de 33 y 27 %. Estos datos difieren con los reportados por Morton *et al.* (2007, 2010) quienes obtienen porcentajes mayores de hasta un 90 % con glicerol.

Estos resultados fueron alentadores, sin embargo debido posiblemente al tiempo de transporte de los epidídimos hasta su procesamiento en el laboratorio, a la velocidad de enfriamiento, y al método de congelación empleado; no se obtuvieron mayores porcentajes de las características espermáticas evaluadas. En consecuencia, no se puede afirmar que estos experimentos no tuvieron el efecto esperado. Lo ideal sería realizar todo el procedimiento desde la obtención de la muestra hasta la criopreservación en un mismo lugar, para evitar alteraciones en los espermatozoides ejercidas por inestabilidad de la temperatura y variaciones en el tiempo de transporte.

VI. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se puede concluir que las concentraciones de 0.9 M de DMSO y 1.16 M de glicerol conservaron mejor las características espermáticas de motilidad, integridad funcional de la membrana plasmática y viabilidad e integridad de la membrana acrosomal, obteniéndose promedios de 35.83, 51.75 y 38.25 % para el DMSO y de 30.83, 45.00 y 33.75 % para el glicerol.
- El etilenglicol al 1.02 M no conservó adecuadamente las características espermáticas de motilidad, integridad funcional de la membrana plasmática y viabilidad e integridad de la membrana acrosomal post descongelamiento, ya que se obtuvieron promedios de 17.42, 32.17 y 21.00 % respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- Experimentar con otros agentes crioprotectores como el dimetilformamida y el dimetilacetamida en distintas concentraciones.
- Realizar la colecta de los testículos/epidídimos y la criopreservación espermática en un mismo lugar, para evitar alteraciones que se puedan presentar debido a su transporte, como la variabilidad de la temperatura y el tiempo de transporte, los que están sujetos a múltiples cambios ajenos al operario.
- Realizar otras curvas de enfriamiento mas cortas, disminuyendo el tiempo de exposición a vapores de nitrógeno.
- Determinar tiempos adecuados de equilibrio o curvas de congelación de acuerdo al crioprotector utilizado, para mejorar los resultados luego de la criopreservación; ya que esta demostrado que algunos crioprotectores como el etilenglicol penetran rápidamente a la célula, permitiendo una congelación más rápida y, por lo tanto, las curvas de congelación prolongadas provocarían un mayor efecto nocivo sobre la célula.

IX. ANEXOS

Fig. 1 Obtención de la muestra de estudio

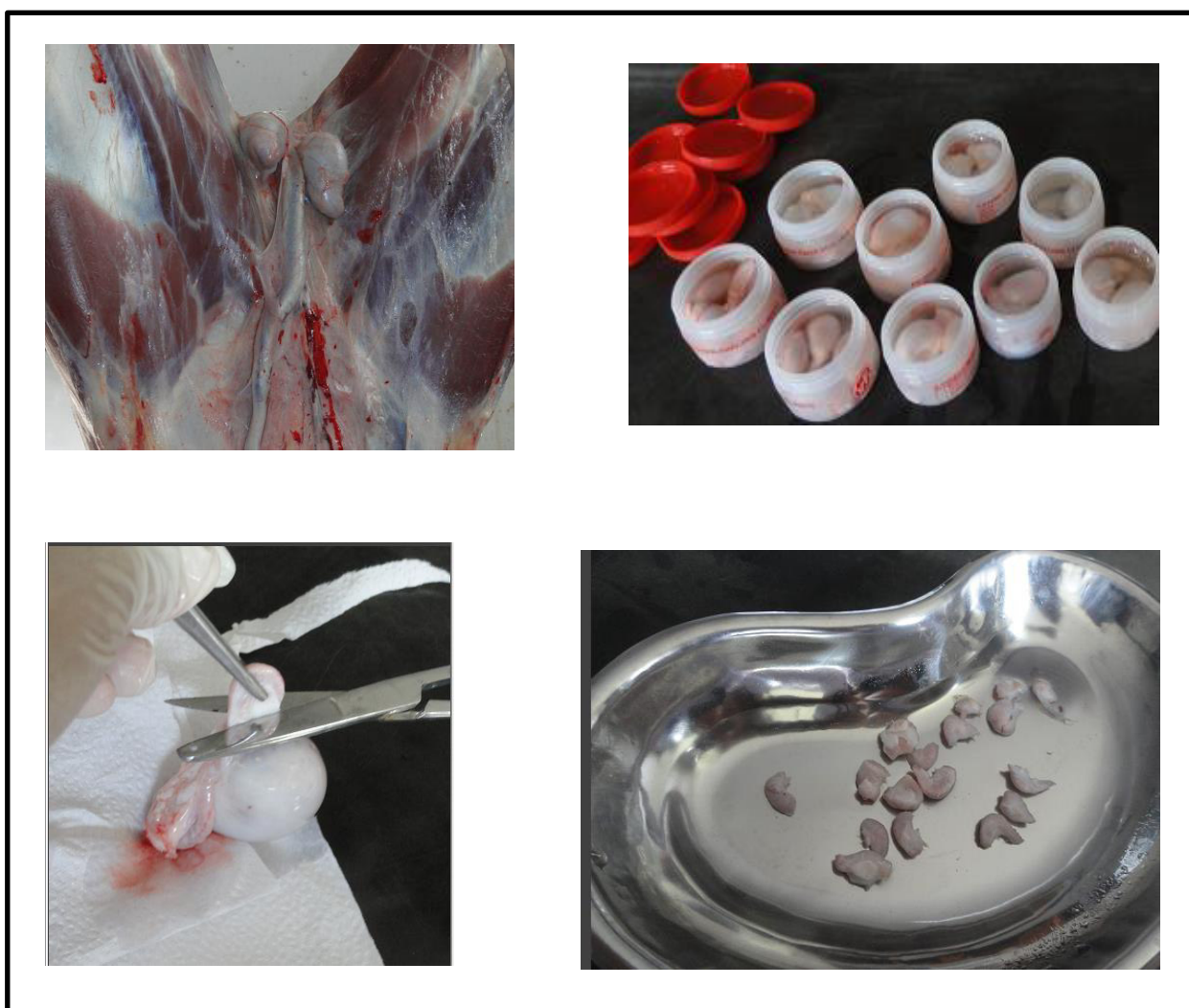


Fig. 2 Recuperación de los espermatozoides epididimarios

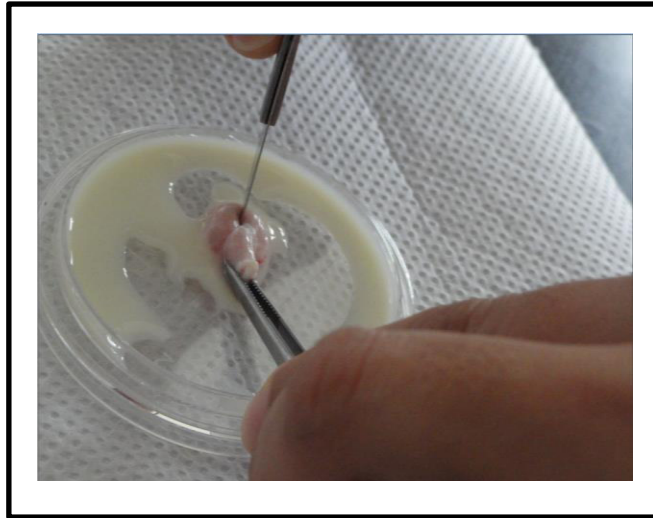


Fig. 7 Procedimiento de los vapores de nitrógeno líquido

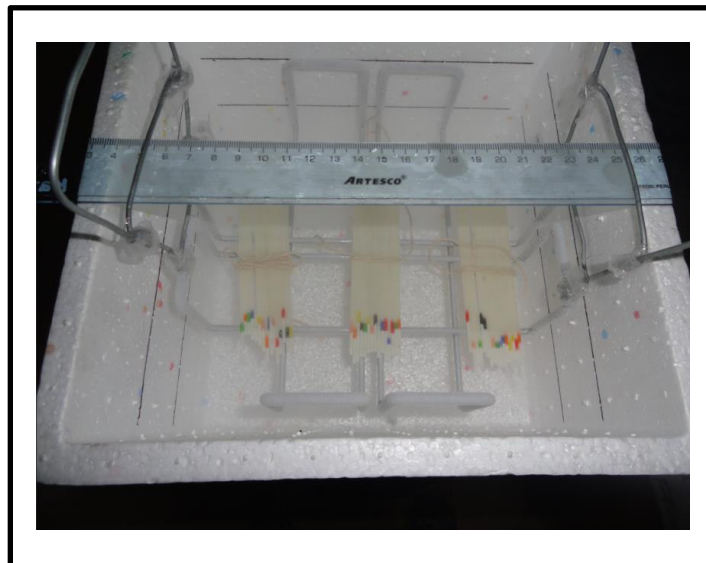
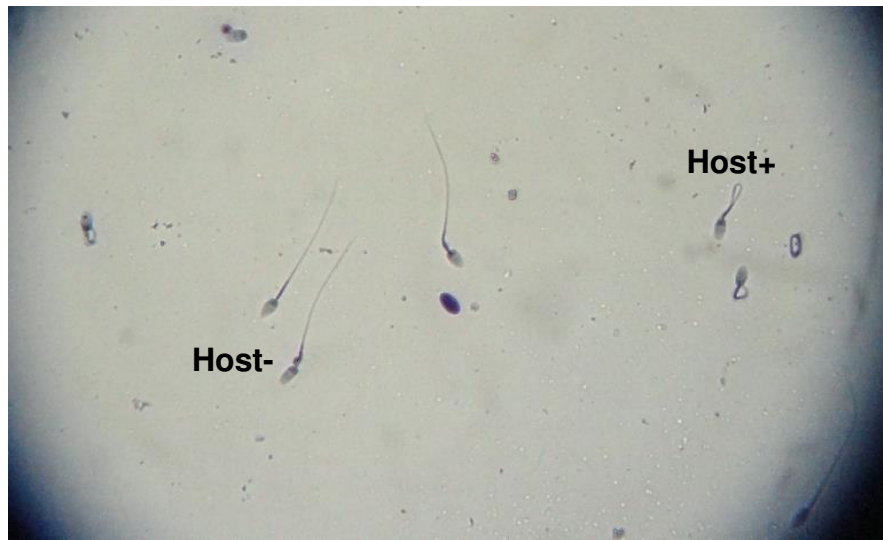
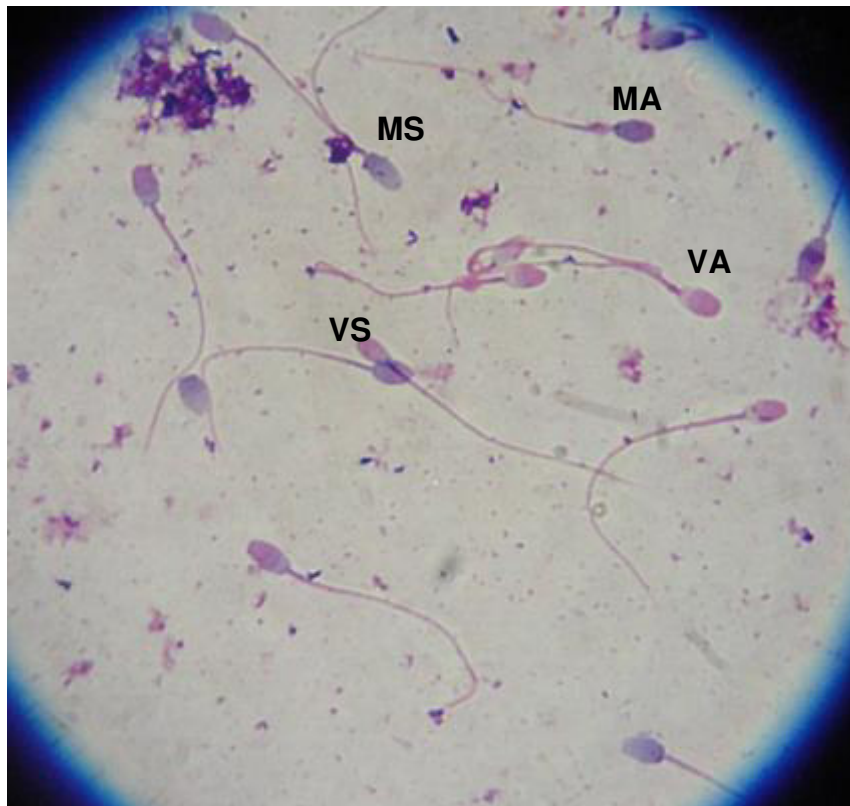


Fig. 8 Evaluación de la Integridad funcional de la membrana espermática
(Prueba hiposmótica)



Dos categorías fueron distinguidas: Host + (espermatozoide con cola enrollada), Host - (espermatozoide con cola sin cambios). Imágenes tomadas por microscopía óptica, 40X.

Fig. 9 Evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal
(Técnica de Doble Tinción Azul Tripan / Giemsa).



Cuatro categorías fueron distinguidas: VA (espermatozoide vivo con acrosoma intacto), VS (espermatozoide vivo con acrosoma desprendido), MA (espermatozoide muerto con acrosoma intacto), MS (espermatozoide muerto con acrosoma desprendido). Imágenes tomadas por microscopía óptica, 40X

ESTADISTICA

Anexo 1. Análisis estadístico del experimento 1

Análisis de Regresión

Resumen del modelo^a

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	0.915	0.837	0.788	0.078

ANOVA^{a,b}

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	.925	9	.103	17.101	0.000
	Residuo	.180	30	.006		
	Total	1.105	39			

Coeficientes^{a,b}

Modelo		Coeficientes no estandarizados		t	Sig.
		β	Error estándar		
1	(Constante)	.291	.042	6.868	.000
	[Epid=1,0]	-.076	.039	-1.970	.058
	[Epid=2,0]	-.119	.039	-3.078	.004
	[Epid=4,0]	.175	.039	4.510	.000
	[Epid=5,0]	.168	.039	4.343	.000
	[Epid=9,0]	0b	.000	0.000	.000
	Conc	1.624	.549	2.956	.006
	Conc2	-5.886	2.333	-2.523	.017
	Conc3	9.111	3.621	2.516	.017
	Conc4	-5.863	2.336	-2.510	.018
	Conc5	1.310	.532	2.463	.020

Anexo 2. Análisis estadístico del experimento 2

Regresión

Resumen del modelo^a

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	0.860	0.740	0.662	0.056

ANOVA^{a,b}

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	.268	9	.030	9.487	0.000
	Residuo	.094	30	.003		
	Total	0.363	39			

Coefficientes^{a,b}

Modelo		Coeficientes no estandarizados		t	Sig.
		β	Error estándar		
1	(Constante)	.211	.031	6.894	.000
	[Epid=21,0]	.076	.028	2.709	.011
	[Epid=22,0]	.042	.028	1.490	.147
	[Epid=23,0]	-.004	.028	-0.136	.893
	[Epid=24,0]	-.130	.028	-4.631	.000
	[Epid=25,0]	0b	.000	0.000	.000
	Conc	.221	.397	0.556	.582
	Conc2	-.148	1.687	-0.088	.931
	Conc3	.252	2.619	0.096	.924
	Conc4	-.266	1.689	-0.157	.876
	Conc5	.078	.385	0.204	.840

Anexo 3. Análisis estadístico del experimento 3

Regresión

Resumen del modelo^a

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	0.854	0.730	0.653	0.072

ANOVA^{a,b}

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	.489	10	.049	9.466	0.000
	Residuo	.181	35	.005		
	Total	0.670	45			

Coefficientes^{a,b}

Modelo		Coeficientes no estandarizados		t	Sig.
		β	Error estándar		
1	(Constante)	.134	.039	3.416	.002
	[Epid=11,0]	.173	.037	4.623	.000
	[Epid=12,0]	.054	.036	1.494	.144
	[Epid=13,0]	.181	.036	5.040	.000
	[Epid=16,0]	.191	.036	5.325	.000
	[Epid=18,0]	.191	.037	5.106	.000
	[Epid=19,0]	0b	.000	0.000	.000
	Conc	.178	.479	0.371	.713
	Conc2	.508	2.015	0.252	.802
	Conc3	-.536	3.130	-0.171	.865
	Conc4	-.015	2.026	-0.007	.994
	Conc5	.075	.463	0.163	.872

Anexo 4. Análisis estadístico del experimento 4

UNIANOVA tMotdes BY tto Epididimo

/RANDOM=Epididimo

/METHOD=SSTYPE(3)

/INTERCEPT=INCLUDE

/POSTHOC=tto(TUKEY)

/CRITERIA=ALPHA(0.05)

/DESIGN=tto Epididimo.

4.1. Análisis univariado de varianza para Motilidad

Notas

Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos1	
	Filtro	<ninguno>	
	Ponderación	<ninguno>	
	Segmentar archivo	<ninguno>	
	N de filas en el archivo de datos de trabajo		48
Control de valores perdidos	Definición de ausencia	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratan como perdidos.	
	Casos utilizados	Las estadísticas se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables del modelo.	
Sintaxis		UNIANOVA tMotdes BY tto Epididimo /RANDOM=Epididimo /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /POSTHOC=tto(TUKEY) /CRITERIA=ALPHA(0.05) /DESIGN=tto Epididimo.	

Factores inter-sujetos

		N
Tratamiento	T1	12
	T2	12
	T3	12
	T4	12
Epididimo	1	4
	2	4
	3	4
	4	4
	5	4
	6	4
	7	4
	8	4
	9	4
	10	4
	11	4
	12	4

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: tMotdes

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Promedio Cuadrático	F	Sig.
Interceptación	Hipótesis	10,341	1	10,341	157,525	,000
	Error	,722	11	,066 ^a		
tto	Hipótesis	1,228	3	,409	93,899	,000
	Error	,144	33	,004 ^b		
Epididimo	Hipótesis	,722	11	,066	15,058	,000
	Error	,144	33	,004 ^b		

a. MS(Epididimo)

b. MS(Error)

Medias cuadráticas esperadas^{a,b}

Origen	Componente de varianza		
	Var(Epididimo)	Var(Error)	Término cuadrático
Interceptación	4,000	1,000	Interceptación, tto
tto	,000	1,000	
Epididimo	4,000	1,000	
Error	,000	1,000	

- a. Para cada origen, la media cuadrática esperada equivale a la suma de coeficientes en las casillas por los componentes de varianza, más un término cuadrático que implica efectos en la casilla de término cuadrático.
- b. Las medias cuadráticas esperadas se basan en la suma de cuadrados del tipo III.

Pruebas post hoc

tto

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: tMotdes

HSD Tukey

(I) tto	(J) tto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
T1	T2	-,350931*	,0269558	,000	-,423845	-,278017
	T3	-,166495*	,0269558	,000	-,239409	-,093581
	T4	-,405465*	,0269558	,000	-,478379	-,332551
T2	T1	,350931*	,0269558	,000	,278017	,423845
	T3	,184436*	,0269558	,000	,111522	,257350
	T4	-,054534	,0269558	,000	-,127448	,018380
T3	T1	,166495*	,0269558	,000	,093581	,239409
	T2	-,184436*	,0269558	,000	-,257350	-,111522
	T4	-,238970*	,0269558	,000	-,311884	-,166056
T4	T1	,405465*	,0269558	,000	,332551	,478379
	T2	,054534	,0269558	,000	-,018380	,127448
	T3	,238970*	,0269558	,000	,166056	,311884

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,004.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

tMotdes

HSD Tukey^{a,b}

tto	N	Subconjunto		
		1	2	3
T1	12	,233433		
T3	12		,399928	
T2	12			,584364
T4	12			,638898
Sig.		1,000	1,000	,200

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 0,004.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.

b. Alfa = 0.05.

4.2. Análisis univariado de varianza para HOST

Notas

Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos1	
	Filtro	<ninguno>	
	Ponderación	<ninguno>	
	Segmentar archivo	<ninguno>	
	N de filas en el archivo de datos de trabajo		48
Control de valores perdidos	Definición de ausencia	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratan como perdidos.	
	Casos utilizados	Las estadísticas se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables del modelo.	
Sintaxis		UNIANOVA thosdes BY tto Epididimo /RANDOM=Epididimo /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /POSTHOC=tto(TUKEY) /CRITERIA=ALPHA(0.05) /DESIGN=tto Epididimo.	

Factores inter-sujetos

		N
Tratamiento	T1	12
	T2	12
	T3	12
	T4	12
Epididimo	1	4
	2	4
	3	4
	4	4
	5	4
	6	4
	7	4
	8	4
	9	4
	10	4
	11	4
	12	4

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: thosdes

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Promedio Cuadrático	F	Sig.
Interceptación	Hipótesis	19,112	1	19,112	323,572	,000
	Error	,650	11	,059 ^a		
tto	Hipótesis	1,182	3	,394	147,449	,000
	Error	,088	33	,003 ^b		
Epididimo	Hipótesis	,650	11	,059	22,109	,000
	Error	,088	33	,003 ^b		

a. MS(Epididimo)

b. MS(Error)

Medias cuadráticas esperadas^{a,b}

Origen	Componente de varianza		
	Var(Epididimo)	Var(Error)	Término cuadrático
Interceptación	4,000	1,000	Interceptación, tto
tto	,000	1,000	
Epididimo	4,000	1,000	
Error	,000	1,000	

c. Para cada origen, la media cuadrática esperada equivale a la suma de coeficientes en las casillas por los componentes de varianza, más un término cuadrático que implica efectos en la casilla de término cuadrático.

d. Las medias cuadráticas esperadas se basan en la suma de cuadrados del tipo III.

Pruebas post hoc

tto

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: thosdes

HSD Tukey

(I) tto	(J) tto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
T1	T2	-,341246*	,0211012	,000	-,398324	-,284169
	T3	-,202881*	,0211012	,000	-,259959	-,145803
	T4	-,411049*	,0211012	,000	-,468127	-,353971
T2	T1	,341246*	,0211012	,000	,284169	,398324
	T3	,138365*	,0211012	,000	,081287	,195443
	T4	-,069803*	,0211012	,012	-,126880	-,012725
T3	T1	,202881*	,0211012	,000	,145803	,259959
	T2	-,138365*	,0211012	,000	-,195443	-,081287
	T4	-,208168*	,0211012	,000	-,265245	-,151090
T4	T1	,411049*	,0211012	,000	,353971	,468127
	T2	,069803*	,0211012	,012	,012725	,126880
	T3	,208168*	,0211012	,000	,151090	,265245

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,003.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

thosdes

HSD Tukey^{a,b}

tto	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
T1	12	,392206	,595087	,733452	,803255
T3	12				
T2	12				
T4	12				
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,003.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.

b. Alfa = 0.05.

4.3. Análisis univariado de varianza para DT

Notas

Entrada	Conjunto de datos activo Filtro Ponderación Segmentar archivo N de filas en el archivo de datos de trabajo	Conjunto_de_datos1 <ninguno> <ninguno> <ninguno>	48
Control de valores perdidos	Definición de ausencia Casos utilizados	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratan como perdidos. Las estadísticas se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables del modelo.	
Sintaxis		UNIANOVA tdt des BY tto Epididimo /RANDOM=Epididimo /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /POSTHOC=tto(TUKEY) /CRITERIA=ALPHA(0.05) /DESIGN=tto Epididimo.	

Factores inter-sujetos

		N
Tratamiento	T1	12
	T2	12
	T3	12
	T4	12
Epididimo	1	4
	2	4
	3	4
	4	4
	5	4
	6	4
	7	4
	8	4
	9	4
	10	4
	11	4
	12	4

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: tdt des

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Promedio Cuadrático	F	Sig.
Interceptación	Hipótesis	12,766	1	12,766	530,083	,000
	Error	,265	11	,024 ^a		
tto	Hipótesis	,917	3	,306	105,434	,000
	Error	,096	33	,003 ^b		
Epididimo	Hipótesis	,265	11	,024	8,309	,000
	Error	,096	33	,003 ^b		

a. MS(Epididimo)

b. MS(Error)

Medias cuadráticas esperadas^{a,b}

Origen	Componente de varianza		
	Var(Epididimo)	Var(Error)	Término cuadrático
Interceptación	4,000	1,000	Interceptación, tto
tto	,000	1,000	
Epididimo	4,000	1,000	
Error	,000	1,000	

- e. Para cada origen, la media cuadrática esperada equivale a la suma de coeficientes en las casillas por los componentes de varianza, más un término cuadrático que implica efectos en la casilla de término cuadrático.
- f. Las medias cuadráticas esperadas se basan en la suma de cuadrados del tipo III.

Pruebas post hoc

tto

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: tdttes

HSD Tukey

(I) tto	(J) tto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
T1	T2	-,304723*	,0219793	,000	-,364176	-,245271
	T3	-,159156*	,0219793	,000	-,218609	-,099703
	T4	-,354434*	,0219793	,000	-,413887	-,294981
T2	T1	,304723*	,0219793	,000	,245271	,364176
	T3	,145567*	,0219793	,000	,086115	,205020
	T4	-,049710	,0219793	,128	-,109163	,009743
T3	T1	,159156*	,0219793	,000	,099703	,218609
	T2	-,145567*	,0219793	,000	-,205020	-,086115
	T4	-,195278*	,0219793	,000	-,254731	-,135825
T4	T1	,354434*	,0219793	,000	,294981	,413887
	T2	,049710	,0219793	,128	-,009743	,109163
	T3	,195278*	,0219793	,000	,135825	,254731

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,003.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

tdt des

HSD Tukey^{a,b}

tto	N	Subconjunto		
		1	2	3
T1	12	,311133	,470289	,615856
T3	12			
T2	12			
T4	12			
Sig.		1,000	1,000	,128

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,003.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.

b. Alfa = 0.05.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Aller J, Rebuffi G, Cancino K, Alberio R. 2003.** Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch Zootec 52: 15-23.
2. **Amann RP, Pickett BW. 1987.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. Equine Veterinary Science 7:145-176.
3. **Anel L, Gerra C, Alvarez M, Anel E, Martinez AF, Boixo CJ, Kaabi M, Herraes P, Paz P. 2002.** Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). Therio 57:577.
4. **Ávila Portillo LM, Madero JL, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, Delgado LG, Gómez C, Lozano JM, Reguero MT. 2006.** Fundamentos de criopreservación. Revista colombiana de obstetricia y ginecología 57:291-300.
5. **Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Háfes B, Bellin ME. 2000.** Semen evaluation. En: Hafez, E.S.E. and Háfes B (eds), Reproduction in farm animals, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 365-375.
6. **Ball BA, Vo A. 2001.** Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. J Androl 22:1061-1069.
7. **Bamba K, Adams CE. 1990.** Freezing rabbit semen by use of BF5 diluent. Lab Anim 24:172-175.
8. **Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. 2010.** Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Rev Inv Vet Perú 21: 145-153.
9. **Barrios A.D. 2002.** Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Valera. Venezuela. pp. 1-14.
10. **Boerke A, Tsai P, García- Gil N, Brewis I, Gadella B. 2008.** Capacitación-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma

membrane: functional relationship with zona binding and the zona- induced acrosome reaction. *Therio* 70:1188-96.

11. **Boiso I. 2001.** Principios básicos de criobiología. *Revista iberoamericana de Fertilidad*. 18:4.
12. **Bravo PW, Flores D, Ordonez C. 1997a.** Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biol. Reprod.* 57:520-524.
13. **Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordonez C .1997b.** Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Therio* 47:619-626.
14. **Bravo PW, Moscoso R, Alarcon V, Ordoñez C. 2002.** Ejaculatory process and related semen characteristics. *Arch Androl* 48:65-72.
15. **Bravo PW. 2002.** The Reproductive Process of South American Camelids. Seagull Printing, Salt Lake City, Utah, USA.
16. **Canorio N. 2008.** Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*). Tesis de Magister en Biología Molecular. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 102p.
17. **Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM. 2003.** Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Therio* 59:743-751.
18. **Carretero M, R. Santa Cruz R, Neild D, Arraztoa C, Fumuso F, Giuliano S. 2013.** Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen en llama (*Lama glama*). *Spermova* 3:174-176.
19. **Chen Y, Foote RH, Brockett CC. 1993.** Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* 30:423-431.
20. **Choez K, Evangelista S, Castillo R, Santiani A. 2013.** Efecto de la motilidad inicial y diferentes concentraciones de glicerol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Spermova* 3: 83-84
21. **Cooper G. 2002.** La célula. 2 da Edición, Marbán Libros. P 467-476.
22. **Curry MR. 2000.** Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* 5:46-52.
23. **De Leeuw FE, Colenbrander B, Verkleij AJ. 1990.** The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim Suppl* 1:95-104.

24. **Deen A, Sumant V, Sahani MS. 2003.** Semen collection, cryopreservation and artificial insemination in the dromedary camel. *Anim Reprod Sci* 77:223–33.
25. **Díaz GB, Ojeda RA. 2000.** Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos; Mendoza, SAREM. Argentina. pp 106.
26. **Didion B, Dobrinsky J, Giles J, Graves C. 1989.** Staining procedure to defect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Garnete Res* 22:51-57.
27. **Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. 1993.** Cold shock damage is due to lipid phase transicions in cell membranes: a demosntration using sperm as a model. *The Journal Exp Zool* 265:432-437.
28. **Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, John Douglas MST, Meryman HT. 1990.** Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* 27:247-268.
29. **Feradis AH, Pawitri D, Suatha IK, Amin MR, Yusuf TL, Sajuthi D, Budiarsa IN, Hayes ES. 2001.** Cryopreservation of epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol* 30:100-106.
30. **Fiser PS, Fairfull RW. 1989.** The effect of glycerol- related osmotic changes on postthaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26:64-69.
31. **Flesh FM, Gadella MB. 2000.** Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process fertilization. *Biochim Biophys. Acta*: 1469:197-235.
32. **Fraser LR, Adeoya- Osiguwa S, Baxendale RW, Mededovic S, Osiguwa OO. 2005.** First Messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl ciclase/cAMP. *J Reprod Dev* 51:37- 46.
33. **Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK. 1995.** Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reprod* 10:1109-1122.
34. **García J, Vila L. 1984.** Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clín Hematol* 6:219-225.

35. **Garner DL, Thomas CA, Gravance CG. 1999.** The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 34:399- 404.
36. **Garner DL, Hafez ESE. 2002.** Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez E.S.E., Hafez B., eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7a ed. México: McGraw Hill Interamericana. p 98-112.
37. **Garnica J, Achata R, Bravo PW. 1993.** Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim Reprod Sci* 32:85-90.
38. **Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. 2008.** Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci* 104:359-369.
39. **Giuliano S, Carretero M, Gambarotta M, Neild D, Trasorras V, Pinto M, Miragaya M. 2010.** Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Anim Reprod Sci* 118: 98-102.
40. **Giuliano SM, Chaves MG, Trasonas VL, Gambarotta M, Neild D, Director A, Pinto M, Miragaya MH. 2012.** Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Anim Reprod Sci* 131:204-210.
41. **Giuliano SM. 2012.** Extracción y evaluación de semen de camélidos sudamericanos. *Spermova* 2:6-9.
42. **Gonzales H. 2008.** Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. *Scientia* 10: 223-234.
43. **Gonzales J, Tadeo J, Ortega C, Toledano A, Vergara M, Ávalos A. 2013.** Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tiempos postmortem en caninos. *Rev Salud Anim.* 35
44. **Graham EF, Schmell MK, Eversen BK, Nelson DS. 1978.** Semen preservation in nondomestic mammals. *Symp Zool Soc London* 43:153–82.
45. **Guerrero AC. 2006.** Cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection with bovine epididymal spermatozoa. Tesis Doctoral. Louisiana: Louisiana State University.
46. **Guthrie HD, Liu J, Critser JK. 2002.** Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 67:1811-1816.

47. **Hafez ESE. 2002.** Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez E.S.E., Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7 Ed. México. Mc Graw Hill. p 441-452.
48. **Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.
49. **Hammerstedt RH, Graham JK. 1992.** Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29:26-38.
50. **Henry M, Snoeck PPN, Cottorello ACP. 2002.** Post- thaw spermatozoa plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology* 58:245-248.
51. **Holt WV. 2000.** Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Therio* 53:47-58.
52. **Hu J-H, Li Q-W, Zan L-S, Jiang Z-L, An J-H, Wang L-Q, Jia Y-H. 2010.** The cryoprotective effect of low- density lipoproteins in extender son bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci* 117:11-17.
53. **Huanca T, González M, Cárdenas O, Mamani- Cato R, Naveros M, Huanca W. 2013.** Uso de la biotecnología reproductiva en la conservación de los recursos genéticos: banco de germoplasma de alpacas de color y llamas. *Spermova* 3:37-40.
54. **Illera M. 1994.** Reproducción de los animales domésticos. 1a Ed. España. AEDOS, p 118- 175.
55. **Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez- Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. 1984.** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70: 219-228.
56. **Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T. 2000.** Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Therio* 54:1477-1498.
57. **Mancisidor SI. 2013.** Efecto del α -tocoferol durante el proceso de criopreservación en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Biologo. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 75p.

58. **Mantovani R, Rofo A, Falomo M, Bailoni L, Vicenti L. 2002.** Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa. *Reprod Nutr Dev* 42:217-226.
59. **Martinez- Pastor F, Garcia- Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraes P, de Paz P, Anel L. 2006.** Comparacion of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Therio* 65:471- 485.
60. **Massip A. 2001.** Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim* 36:49-55
61. **Maxwell WMC, Evans O. 1990.** Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia S.A. Madrid. *Can* 34:19-32.
62. **Mayenco- Aguirre AM, Gómez- Cuétara C. 1996.** Viability of canine sperm frozen with two levels of glicerol. 3rd International Symposium on Reproduction of dogs, cats and exotic carnivores. Veldoven. The Netherlands.
63. **Mazur P. 1970.** Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 168:939-949.
64. **Mazur P. 1984.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247:125-142.
65. **McEvoy T, Kyle C, Slater D, Adam C, Bourke D. 1992.** Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. *J Reprod Fert* 9:48
66. **Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodriguez JL. 2002.** Current status of cryopreservation: why isn't it better?. *Therio* 57:327-344.
67. **Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC. 1994.** Incorporating of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Therio* 42:849-858.
68. **Mondal M., Karunakaran M., Lee K., Rajkhowa C. 2010.** Characterization of Mithun (*Bos frontalis*) ejaculates and fertility of cryopreserved sperm. *Anim Reprod Sci* 118:210-216.
69. **Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. 2007.** Cryopreservation of epididymal alpaca sperm: a comparison of citrate- Tris- and lactose- based diluents and pellets and straws. *Reprod Fertil Dev* 19:792-796.

70. **Morton KM, Vaughan JL, Maxwell WMC. 2008.** The continued development of artificial insemination technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, ACT, Australia. 205p.
71. **Morton K, Evans G, Maxwell W. 2010.** Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen- thawed epididymal alpaca sperm. *Therio* 74:311-316.
72. **Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002.** Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen- thawed bull semen. *Therio* 57:1695-1706.
73. **Niasari-Naslaji A, Mosafieri S, Bahmani N, Gerami A, Gharahdaghi A, Abarghani A, Ghanbari A. 2007.** Semen cryopreservation in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) using SHOTOR diluent: Effects of cooling rates and glycerol concentrations. *Therio* 68:618-625.
74. **Oostra, A. 2008.** Sobre la solución de ecuaciones de tercer y cuarto grado. *Revista Tumbaga*, 3, 174-186.
75. **Ordóñez M J, Verastegui H J. 2007.** Efecto de los crioprotectores (Glicerol y Etilenglicol) en la criopreservación de semen de alpaca (*Lama pacos*). Tesis de Ingeniero Zootecnista. Huancavelica: Univ. Nac. de Huancavelica. 55p.
76. **Ordóñez C, Cucho H, Ampuero E, Antezana W, Cayo S. 2013.** Inseminación artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación. *Spermova* 3: 65-66.
77. **Parks JE, Graham JK.1992.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Therio* 38:249-222.
78. **Parrish J, Susko- Parrish J, Uguz C, First N. 1994.** Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'- monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol Reprod* 51:1099-1108.
79. **Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradón PG. 1998.** Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Therio* 50:163-174.

80. **Quintano J. 2002.** Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nac. del Altiplano. 45p.
81. **Reyes- Moreno C, Boilard M, Sullivan R, Sirard M. 2002.** Characterization and identification of epididimal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. Biol. Reprod 66:159-166
82. **Rodriguez C. 2009.** Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Magister. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 72 p.
83. **Salamon S, Maxwell WMC. 1995.** Frozen storage of ram sernen l. Processing. freezing, thawing and fertility ter cervical insemination. Anim Retirad Sci 37:185-249.
84. **Salamon S, Maxwell WMC. 2000.** Storage of ram semen. Anim Reprod Sci 62:77-111.
85. **Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005.** Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. Asian J Androl 7:303-309.
86. **Santiani AA, Evangelista VS, Valdivia CM, Risopatrón GJ, Sánchez GR. 2013.** Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. Therio 79:842–846
87. **Silva AR, Silva HV.2012.** Avances en criopreservación de semen en caninos. Spermova 2:13-18.
88. **Storey BT, Noiles EE, Thompson KA. 1998.** Comparison of glycerol, other polyols, thehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology 37:46-58.
89. **Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. 2005.** Efecto de los procesos de criopreservación sobre ta fertilidad seminal. Analecta Veterinaria 25:28-35.
90. **Sumar J. 2002.** Llamas y alpacas. En: HAfez ESE, Hafez B, eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. Mexico: Mc Graw Hill Interamericana p 224-242.

91. **Terreros M, Huanca W, Arriaga I, Ampuero A. 2015.** Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 26: 420-426
92. **Tibary A, Memon MA. 1999.** Reproduction in the male South American Camelidae. *J. Camel Prac. Res.*6:235-248.
93. **Tibary A, Vaughan J. 2006.** Reproductive physiology and infertility in male south American camelids: A review and clinical observations. *Small Rumin Res* 61:283-298.
94. **Tulsiani D, Abou-Haila A, Loeser C, Pereira, B. 1998.** Review: The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 240: 151-164.
95. **Tulsiani D. 2006.** Glycan- modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis. an overview of their potencial role in sperm maturation. *Mol Cell Endocrinol* 250:58-65.
96. **Valdivia M, Ruiz M, Bermudez L, Quinteros S, Gonzáles A. 1999.** Criopreservación de semen de alpacas. *Proc II Congreso sobre camélidos, Cusco – Perú.*
97. **Visconti PE, Bailey J, Moore G, Pan D, Olds- Clarke P, Kopf G. 1995.** Capacitation of mouse spermatozoa. I Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121:1129-1137.
98. **Visconti PE, Floman HM. 2010.** Mechanisms of sperm- egg interactions: between sugars and broken bonds. *Sci Signal* 3:35.
99. **Watson PF 1979.** The preservation of semen in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 1:283-350.
100. **Watson PF. 1981.** The role of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg- yolk lipoprotein. *J Reprod Fert* 62:483-492.
101. **Watson PF. 1995.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing function. *Reprod Fert Dev* 7:871-891.
102. **Watson P.1990.** Artificial insemination and the preservation of semen. *Marshall's Phvsiology of Reproduction.2: Reproduction in the male. Edimburgo. p 747-869.*

103. **Watson PF. 2000.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60:481- 492.
104. **Way AL, Henault MA, Killian GJ. 1995.** Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Therio* 43:1301-1316.
105. **Wei SI, Ping Z, Yahui L, Andras D, Weizhi JI. 2004.** Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) Sperm. *American Journal of Primatology* 62:301-306.
106. **Wessel MT, Ball BA. 2004.** Step- wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. *Animal Reprod Science* 84:147-156.
107. **Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. 2004.** Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48:146-156.
108. **Yanagimachi R. 1993.** Mammalian Fertilization. En: Knobil E, Neil J, ed. *Physiology of Reproduction*. 1a ed. NY Raven Press, p 189- 317.
109. **Yanagimachi R. 1994.** Mammalian fertilization. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (eds.) Raven Press (New York, USA). p 189-317.
110. **Zhao X, Huang M, Nie C, Zhang K, Chen X. 1996.** Effect of different extenders on motility, survival and acrosomal integrity of camel spermatozoa frozen in ampoules. *J. Camel Prac. Res.* 3:23-25.